

KÜLÖNBÖZŐ MÉRETŰ ÉS FELÜLETI BORÍTOTTSÁGÚ EZÜST
NANORÉSZECSEK AGGREGÁCIÓJÁNAK ÉS TOXICITÁSÁNAK
KAPCSOLATA BIORELEVÁNS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

BÉLTEKY PÉTER

TÉMAVEZETŐK:
PROF. KÓNYA ZOLTÁN
DR. KIRICSI MÓNICA



KÖRNYEZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
ALKALMAZOTT ÉS KÖRNYEZETI KÉMIAI TANSZÉK

SZEGED
2021

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	4
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1.	Nanoszerkezetek biológiai vonatkozásai.....	7
2.1.1.	Nanorészecskék előfordulása a természetben.....	7
2.1.2.	Nanorészecskék kölcsönhatása az élő szervezetekkel	9
2.1.2.	Nanorészecske koronák	12
2.1.3.	Toxicitás vizsgálatok és jelentőségük.....	14
2.2.	Nanorészecskék kolloidstabilitása.....	17
2.2.1.	Aggregáció.....	17
2.2.2.	A dinamikus fényszórásmérés és zéta-potenciál jelentősége.....	22
2.3.	Ezüst nanorészecskék	26
2.3.1.	Ezüst nanorészecskék jelentősége és előállítása	26
2.3.2.	Ezüst nanorészecskék jellemzése.....	30
2.3.2.1.	<i>Méret és Morfológia – A Transzmissziós elektron mikroszkópia és jelentősége.....</i>	<i>30</i>
2.3.2.2.	<i>Felületi plazmon rezonancia – Az ultraibolya-látható spektroszkópia jelentősége</i>	<i>33</i>
3.	CÉLKITŰZÉS	35
4.	KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	36
4.1.	Ezüst nanorészecskék szintézise.....	36
4.1.1.	Citrát csoportokkal stabilizált nanorészecskék előállítása és növesztése	36
4.1.2.	Polivinil-pirrolidonnal stabilizált nanorészecskék előállítása.....	37
4.1.3.	Zöld teával stabilizált ezüst nanorészecskék előállítása	37
4.2.	Részecskék karakterizálása.....	38
4.3.	Aggregációs vizsgálatok.....	38
4.4.	<i>In vitro</i> toxicitási kísérletek	40
4.4.1.	Citotoxicitás tesztek.....	40
4.4.2.	Antimikrobiális vizsgálatok	42
5.	EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK	44
5.1.	Kémiai karakterizálás	44
5.2.	Aggregációs vizsgálatok.....	49
5.2.1.	A pH hatása az ezüst nanorészecske aggregációra	49
5.2.1.1.	<i>Különböző részecskeméretetek mellett</i>	<i>49</i>

5.2.1.2. <i>Különböző stabilizáció mellett</i>	55
5.2.2. A nátrium-klorid hatása az ezüst nanorészecske aggregációra.....	61
5.2.2.1. <i>Különböző részecskeméretetek mellett</i>	61
5.2.2.2. <i>Különböző stabilizáció mellett</i>	66
5.2.3. A glükóz és glutamin hatása az ezüst nanorészecske aggregációra.....	71
5.2.3.1. <i>Különböző részecskeméretetek mellett</i>	71
5.2.3.2. <i>Különböző stabilizáció mellett</i>	73
5.2.4. Sejtmédium alkotók hatása az ezüst nanorészecske aggregációra.....	76
5.2.4.1. <i>Különböző részecskeméretetek mellett</i>	76
5.2.4.2. <i>Különböző stabilizáció mellett</i>	81
5.3. <i>In vitro</i> vizsgálatok	85
5.3.1. Aggregáció függő citotoxicitás vizsgálatok.....	85
5.3.1.1. <i>Különböző részecskeméretetek mellett</i>	85
5.3.1.2. <i>Különböző stabilizáció mellett</i>	87
5.3.2. Aggregáció függő antimikrobiális vizsgálatok	88
5.3.2.1. <i>Különböző részecskeméretetek mellett</i>	88
5.3.2.2. <i>Különböző stabilizáció mellett</i>	89
6. ÖSSZEFOGLALÁS	91
7. SUMMARY	95
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	99
IRODALOMJEGYZÉK.....	100
MELLÉKLETEK.....	114

1. BEVEZETÉS

Richard Feynman 1959-es, „*There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics*” névre keresztelt előadása egy új korszakát nyitotta meg a technológiai fejlődésnek.¹ Provokatív kérdése, miszerint „Miért ne írhatnánk fel az Encyclopedia Britannica mind a 24 kötetét egyetlen gombostű fejére?”, egy új szemléletmódot indított el, amely mára a nanotechnológia területévé nőtte ki magát. A nanotechnológia a tudomány és technika azon tárgyköre, amely különböző nanoszerkezetek előállításával, jellemzésével és felhasználásával foglalkozik. Nanoszerkezeteknek azokat az anyagokat nevezzük, amelyeknek legalább egy térbeli dimenziója hozzávetőlegesen 1 és 100 nanométer (10^{-9} méter) közé esik.² Ebben a mérettartományban az anyagok eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek a megszokott, tömbfázisú változataikhoz képest. Az új tulajdonságok megjelenését a nano-méretű anyagok megnövekedett felület/térfogat aránya eredményezi, amely megváltozott energiaviszonyokhoz vezet. Habár a környezetünket felépítő, illetve az élet alapjául szolgáló anyagok nagy része is ebbe a kategóriába sorolható, napjainkra jelentőssé vált az antropogén eredetű, illetve ipari úton gyártott nanorészecskék mennyisége is körülöttünk.³ Ez többek között annak is köszönhető, hogy a jelentős húzóágazatok mellett, mint például a vegyipar, építőipar és az elektronika, a környezettudományos és orvosbiológiai területeken is egyre nagyobb teret hódítanak a speciális feladatra fejlesztett nanoméretű szerkezetek.⁴

Az iparilag gyártott nanoanyagok közül, biológiai szempontból az ezüst nanorészecskék jelentősége kiemelkedő, köszönhetően kiváló antimikrobiális és citotoxikus hatásuknak. Ahogy a nanorészecskékre általában, úgy az ezüstre is igaz az, hogy az aktivitása a részecskemérettel és alakkal alapvetően befolyásolható. A részecskeméret esetében ez különösen jól ismert jelenség; általánosan elfogadott megfigyelés az, hogy a méretük csökkentésével az ezüst nanorészecskék toxicitása nő.^{5,6} A nanoezüst erős, általános toxicitását jól szemlélteti, hogy a mai napig kevés olyan tudományos publikáció ismert, amely ezüstre rezisztens mikrobákat mutatna be, ráadásul ezek a törzsek is mindössze az ezüst ionokkal szemben bizonyultak ellenállónak, és ahogy a későbbiekben tárgyalni fogjuk, nem ez az egyetlen lehetséges mechanizmusa a nanotoxicitásnak.⁷ Ennek a kiváló és precízen módosítható tulajdonságnak köszönhetően az ezüst nanorészecskék számos kereskedelmi forgalomban kapható termékben megtalálhatók.^{8,9} Nanoezüsttel találkozhatunk olyan használati tárgyakban, mint a kozmetikumok, háztartási eszközök, textilek és élelmiszer-

csomagoló, de fellelhetők orvosbiológiai felhasználások során is, akár mint antimikrobiális hatóanyagok, célzott hatóanyag szállító rendszerek, bioszenzorok, rákterápiás szerek vagy molekuláris képalkotó eljárások kontrasztanyagai.⁵ Az ilyen, és ezekhez hasonló termékek hasznossága mellett azonban több olyan tényező vizsgálata háttérbe szorult, amelyek a hétköznapi anyagok esetében kevésbé relevánsak, azonban mélyrehatóan befolyásolhatják a nanoméretű rendszerek hosszútávú hatásait és kockázatait.

Az egyik ilyen jelentős folyamat az aggregáció, ami a folyadékokban diszpergált részecskék „összetapadását” jelenti.^{10,11} A nanorészecskék kiemelkedően magas fajlagos felületük miatt magas felületi energiájával rendelkeznek, amelyet a rendszer a termodinamikai energiaminimumra való törekvés érdekében csökkenteni igyekszik. Ez a törekvés a részecskék közötti vonzó kölcsönhatások formájában jelenik meg, így az aggregáció éppen a nanomérettartományra jellemző tulajdonságok csökkenését és megszűnését eredményezheti. A nanorészecske szuszpenziók kolloidstabilitása megfelelő erősségű taszító kölcsönhatások kialakításával biztosítható, amelyek kinetikai úton képesek stabilizálni a kolloid rendszereket.¹¹ Ezüst nanorészecskék esetén a legelterjedtebb eljárások különböző stabilizálószerke felületi adszorpcióján alapulnak. A lehetséges stabilizálószerke kémiai összetételük szempontjából nagyon változatosak, működési mechanizmusukat tekintve azonban három fő csoportba sorolhatók, amely szerint megkülönböztethetünk elektrosztatikus, sztérikus és elektrosztérikus stabilizálószerkeket.¹²

Elektrosztatikus stabilizáció esetében a részecskék felületén olyan töltéssel rendelkező ionok és kismolekulák találhatók, amelyek két nanorészecske találkozásakor megfelelően nagy elektrosztatikus taszítást idéznek elő ahhoz, hogy ellensúlyozzák a részecskék közötti vonzó kölcsönhatásokat. Sztérikus stabilizáció esetén a felületi borítást olyan makromolekulák, rendszerint polimerek adják, amelyek saját kiterjedésük és alakjuk által gátolják a részecskék aggregációját. Elektrosztérikus esetben pedig az előző két mechanizmus egyesül, ilyenkor a stabilizáció polielektrolitok által valósul meg.

Habár a nanorészecske szuszpenziók kolloidstabilitása laboratóriumi körülmények között jól kontrollálható, az életünk szempontjából fontos rendszerekben, mint a természetes ökoszisztémák, illetve az élő szervezetek, ez az egyensúly már korántsem triviális. A biológiai rendszerekben előforduló pH viszonyok, illetve elektrolit és biomolekula koncentrációk nagymértékben befolyásolni képesek a nanoméretű anyagok kolloidstabilitását, az ebből következő aggregáció és felhalmozódás pedig beláthatatlan következményekkel járhat az élet minden

területén. Ez különösen igaz a legnagyobb mennyiségben gyártott és forgalmazott nanorészecske csoportra, a nanoezüstre.

Mivel a nanoanyagok különleges tulajdonságaihoz hasonlóan, az aggregációnak szintén a megnövekedett felület/térfogat arány a mozgatórugója, az ilyen rendszerek hatásmechanizmusa és kolloidstabilitása elválaszthatatlan tényezők, azonban a gyakorlatban az utóbbi sajnos rendszerint háttérbe szorul. Doktori munkám során különböző ezüst nanorészecske szolok szintézisével, jellemzésével és aggregációs viselkedésének értelmezésével foglalkoztam biológiailag releváns körülmények között. Ezzel összefüggésben azt is részletesen tanulmányoztam, hogy miként befolyásolja a részecskeaggregáció a nanorészecskék citotoxicitását és antimikrobiális aktivitását. A kísérleteket két fő tulajdonság mentén végeztük. Egyfelől megvizsgáltuk az ezüst nanorészecskék méretének hatását a bioreleváns kolloidstabilitásra, hiszen a részecskeméret az egyik legalapvetőbb tulajdonság, amivel a kapcsolódó szakirodalom foglalkozik.¹³ A második nézőpont pedig a felhasznált stabilizálószer hatása volt, hogy megismerhessük a különböző stabilizáló mechanizmusok fő előnyeit és hátrányait. A részecskék morfológiai vizsgálata során megbizonyosodtunk a minták összetételéről és minőségéről, az aggregációs vizsgálatok során pedig meghatároztuk az aggregációt előidéző legjelentősebb körülményeket, illetve tanulmányoztuk a biomolekulák jelentőségét a kolloidstabilitás szempontjából. Végezetül, a biológiai vizsgálatok során egy új szemléletmód segítségével jellemezni tudtuk a részecskeaggregáció közvetlen hatását a toxicitásra, ezzel alátámasztva az elképzelést, hogy az elsődleges hatásmechanizmusok pontos feltárásán túl, a felhasználási közegre jellemző kolloidstabilitás ismerete is elengedhetetlen nanorészecskék hatékony alkalmazása érdekében.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Nanoszerkezetek biológiai vonatkozásai

2.1.1. Nanorészecskék előfordulása a természetben

Habár hajlamosak vagyunk a nanoméretű szerkezetekre úgy tekinteni, mint a technológia modern vívmányaira, valójában csak a szemlélet újszerű; nanorészecskék már a földi élet kezdete előtt megtalálhatók voltak a bolygónkon. Egyes feltételezések szerint a nano-határfelületeknek kulcsfontosságú szerep jutott a földi élet kialakulásában, mert katalizálhatták az élethez szükséges makromolekuláris komponensek polimerizációját, a protosejtek önszerveződését, illetve az evolúció kezdeti szakaszában a bakteriális sejtfalak kialakulását.¹⁴⁻¹⁷ Az ilyen megfontolások alapján a nanorészecskéket csoportosíthatjuk az eredetük szerint és megkülönböztethetünk természetes és antropogén nanoanyagokat, az utóbbi csoportot pedig tovább bonthatjuk járulékos és tudatosan gyártott alcsoportokra.³

A Földön legnagyobb mennyiségben előforduló nanorészecskék természetes eredetűek. Ide sorolhatjuk a talajrétegek eróziójával kialakuló, és a természetes vizek által széthordott fém-oxid, szulfid, karbonát, foszfát stb. alapú részecskéket, a levegőben terjedő ásványi porokat és vulkáni eredetű szervesetlen szemcséket, vagy az ugyancsak erózióval, illetve mineralizációval kialakuló agyag-alapú nanorészecskéket, amelyek a Föld nanorészecske-készletének legnagyobb részét teszik ki (10^7 - 10^8 Tg).¹⁸ Ide sorolhatók továbbá a mikrobiális folyamatokhoz köthető nanorészecskék, mint például a magnetotaktikus baktériumok helyváltoztató mozgásának irányításáért felelős magnetoszómák vas-oxid nanorészecskéi.¹⁹

A járulékos nanoanyagok kémiai értelemben lehetnek szerves és szervesetlen aggregátumok, kristályok, vagy például kátrány cseppek.³ Ezalatt a csoport alatt olyan részecskéket értünk, amik ugyan emberi tevékenységhez köthetők, kialakulásukról azonban sokáig nem volt tudomásunk, mivel többnyire a megfelelő mérés technika megjelenése előtt már „termeltük” őket mint egyéb, hétköznapi folyamatok melléktermékei. Járulékos nanorészecskék találhatók a koromban, a hegesztési füstben, illetve kialakulnak ipari és bányászati műveletek során is.²⁰ Habár az ipari forradalom óta a járulékos nanorészecskék mennyisége annyira megugrott, hogy némely területeken vetekedhetnek a természetes eredetű nanoanyagok mennyiségével, a földi életre gyakorolt hatásukról mégis sokkal kevesebbet tudunk, mint a természetes nanorészecskék esetében.³ Erre talán a legjobb példa az utóbbi időben egyre nagyobb figyelmet kiváltó, a polimer alapú hulladékok bomlásából keletkező mikro-, és nanoműanyagok, amelyek komolyan

befolyásolják a vízi élővilágot. Egyes becslések szerint, éves szinten akár 2,4 millió tonna mikro-, és nanoműanyag kerülhet az óceánokba a folyóvizek által, az élő szervezetekre gyakorolt hatásuk pedig az egyes műanyagok anyagi minőségétől függően változhat.^{21–23}

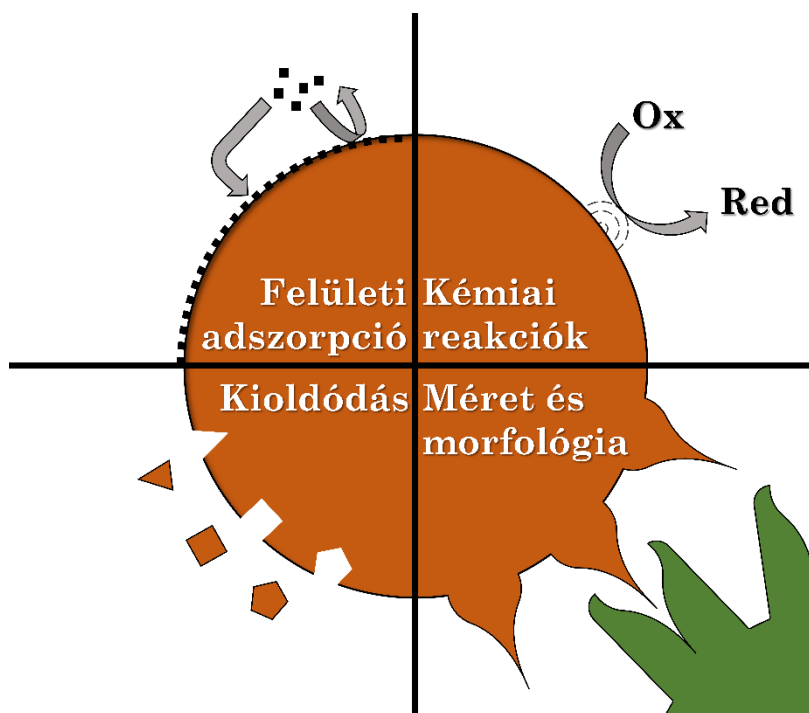
A tudatosan gyártott nanoanyagok csoportját a hagyományos értelemben vett „nanorészecskék” teszik ki, amelyeket valamilyen konkrét feladat, vagy funkció ellátásának érdekében hoztak létre. Habár ez a csoport kevesebb mint egy évszázados történelemre tekint vissza, az ide sorolható nanoszerkezetek egyre nagyobb jelentőséggel bírnak a mindennapi életünkben.³ A modern gyártási és vizsgálati módszerek lehetővé teszik a nanoanyagok összetételének és morfológiájának tetszőleges módosítását, egyedülálló tulajdonságokkal rendelkező szerkezeteket eredményezve. A legnagyobb mennyiségben szintetizált nanorészecskék a titán-dioxid (TiO_2), szilika (SiO_2), vas (Fe), cink-oxid (ZnO), alumínium-oxid (Al_2O_3), cérium-oxid (CeO_2), réz (Cu), ezüst (Ag), szén nanocsövek (CNT), grafén és a kerámia alapú nanokompozitok.²⁴ Felhasználási területeik a teljesség igénye nélkül például az élelmiszeripar, kozmetika, építőipar, katalízis, elektronika és orvosbiológia.^{25–28}

A nanorészecskék származásuktól függetlenül bekerülnek az élet körforgásába, ami a biológiai rendszerek minden szintjén következményekkel jár. Ezek az emberi élet szempontjából pozitív és negatív kimenetelűek is lehetnek. Mikrobák tekintetében a nanoméretű szerkezetek megjelenése új és hatékony antimikrobiális, fertőtlenítő termékeket jelent, azonban a kontrollálatlan termelés és felhasználás a különböző mikrokörnyezetek megváltozását eredményezheti, ami új ökológiai niche-ek kialakulásához, illetve betegségekhez, például diszbiózishoz vezethetnek.³ Növények esetén (főként a nanorészecskék antimikrobiális hatása miatt) jobb termeléshozamokat érhetünk el, azonban ez a nanoanyagok felhalmozódásával járhat a táplálékláncban.³ A nanoszerkezetek előnyei a állatok – és emberek – esetében a legjelentősebbek, hiszen a pozitív egészségügyi hatások mellett ide sorolhatunk minden technológiai vívmányt, ami nanorészecskéken keresztül könnyíti meg mindennapi életünket. Azonban nem feledkezhetünk meg a nanoanyagok esetleges nem várt hátrányos mellékhatásairól sem, amelyek részletei az egyre bővülő tudományos eredmények ellenére még nem teljesen tisztázottak.^{3,29,30}

A nanorészecskék egyszerre hordoznak magukban hatalmas lehetőségeket és kockázatokat. A lehetőségeket csak akkor tudjuk kihasználni, ha a felelősségteljes felhasználásukhoz adottak a körülmények: mélyrehatóan meg kell ismerjünk a nano-határfelületek és biológiai rendszerek közötti kölcsönhatásokat.

2.1.2. Nanorészecskék kölcsönhatása az élő szervezetekkel

Az előző fejezet alapján látható, hogy a nanoméretű szerkezetekkel való érintkezés sokkal általánosabb jelenség, mint elsőre gondolhatnánk. Mindezek ellenére a nanoanyagok földi életre gyakorolt hatásáról jóval kevesebbet tudunk, mint a tömbi, vagy akár molekuláris szintű biológiailag aktív anyagokról, ami főként annak köszönhető, hogy hatásaikat több, különböző kölcsönhatás együttese eredményezi. Mivel ezek a kölcsönhatások eltérő környezetben másként és más arányokban jelentkezhetnek, a pontos ismeretük elengedhetetlen ahhoz, hogy a részecskék viselkedése egy adott szituációban meghatározható legyen. A következőkben a legfontosabb kölcsönhatásokat fogjuk áttekinteni, az 1. ábrán látható csoportosítás mentén, megkülönböztetve a felületek által katalizált kémiai reakciókat, részecskemérettől és morfológiától függő kölcsönhatásokat, kioldódásos reakciókat és felületi adszorpciós reakciókat.



1. ábra Nanorészecskék biológiai szempontból jelentős felületi kölcsönhatásai

A biológiai aktivitást eredményező kölcsönhatások első csoportjába a nano-határfelület által katalizált kémiai reakciók tartoznak. Habár a nanorészecskék felületének kémiai összetételétől függően számtalan reakció játszódhat, toxikológiai szempontból a redoxireakciók a legjelentősebbek, amelyek oxidatív stressz formájában nyilvánulnak meg. Redoxireakciók létrejöhetnek spontán módon például átmeneti fém nanorészecskéken, redox aktív szerves

bevonatokon (pl. kinonok), inert nanoszerkezetekben maradt katalizátor szennyeződéseken (pl. szén nanocsövek szennyeződései esetében), illetve megemlíthetünk indukált mechanizmusokat is, mint például a titanát nanorészecskék fotokatalitikus aktivitását, amelyhez UV sugárzás szükséges.³¹ Ezeken a reaktív határfelületeken a molekuláris oxigénből szabadgyökök keletkeznek, amelyeket gyűjtőnéven reaktív oxigénszármazékoknak (ROS, *reactive oxygen species*) nevezünk. Az oxidatív stressz folyamata általában szuperoxid gyökök ($\cdot\text{O}_2^-$) képződésével kezdődik, ezek a gyökök pedig további reakciók során egyéb ROS származékokat, például hidrogén-peroxidot (H_2O_2), hidroxil gyököt ($\cdot\text{OH}$), szinglet oxigént ($^1\text{O}_2$) stb. generálnak, amelyek ezután az élő sejtek organelleit károsítják. Az oxidatív sejtkárosodás nanorészecskéktől függetlenül is lejátszódó folyamat, amely az öregedés mellett olyan betegségek megjelenése esetén is fontos faktor, mint a daganatok, a kardiovaszkuláris megbetegedések, légzőszervi és vesebetegségek, stb.³² Habár az oxidatív stressz általános jelenség, a finom szemcsézettségű anyagok belélegzése – egy már régóta ismert veszélyforrás – szintén összefüggésbe hozható a nano-határfelület által katalizált ROS képződéssel.^{33,34} A nanorészecskék jelenléte azonban nem feltétlenül jár együtt az oxidatív stressz növekedésével. Egy érdekes és újszerű kutatási terület az úgynevezett „nanozimek” csoportja.³⁵ A nanozimek olyan (többnyire fém, vagy fém-oxid alapú) nanoszerkezetek, amelyek biomimetikus módon bizonyos enzimek funkcióit képesek utánozni. Ilyen funkció lehet például a szabadgyökmegkötő (*scavenging*) hatás is, amely épp az oxidatív stressz csökkenését eredményezi.

A második csoportba azok a kölcsönhatások tartoznak, amelyeket a részecskék méretéhez és morfológiájához köthetünk. Egyfelől a méret közvetlen kapcsolatban áll a fajlagos felülettel, így a nano mérethez köthető tulajdonságok erősségével, azonban biológiai vonatkozások szempontjából ennél specifikusabb kölcsönhatásokat is megemlíthetünk. Kutatások bizonyítják, hogy a méret összefüggésbe hozható a nanorészecskék biológiai membránokon való átjutásának hatékonyságával,^{36,37} hiszen megfelelően kicsi (<6 nm) arany nanorészecskék képesek akár a sejtmagba is bejutni, míg az ennél nagyobb (~10 nm) részecskék csak a citoplazmáig jutnak el.³⁸ A mérethez hasonlóan fontos paraméter lehet a részecskék alakja is; a gömbszerű részecskék könnyebben juthatnak a sejtekbe endocitózissal, mint a nanópálcikák és csövek, ugyanakkor egyfalú szén nanocsővel könnyebben blokkolhatunk kalcium csatornákat, mint azonos anyagi minőségű, de gömb alakú fullerénnel.³⁹ Az alak toxicitásbeli különbségeket is eredményezhet. Hidroxiapatit részecskék esetében például, a csöves és lemezes nanoszerkezetek toxikusabbnak

bizonyultak, mint a gömb és pálcika alakú morfológiák, amely jelenség háttérében az áll, hogy a csövek és lemezek könnyebben képesek mechanikailag roncsolni a sejtmembránokat.⁴⁰

A kölcsönhatások harmadik csoportjába a kioldódással járó reakciók tartoznak. Kioldódás során a nanorészecskék része, vagy egésze fizikai, vagy kémiai úton feloldódik és hatását atomi, molekuláris szinten fejti ki. Jó példa erre a célzott gyógyszeradagoló rendszerek esetén bevett stratégia, amely során olyan nanoméretű adszorbenseket, vagy kapszulákat készítünk, amelyek a szállított hatóanyag molekulákat csak meghatározott helyen és körülmények között adják le, így csökkentve a nem kívánt mellékhatásokat.⁴¹ A célzott hatóanyag szállításon túl ide vehetjük a fém és fém-oxid nanorészecskék oldódását is, amely a nanotoxikológia egyik jelentős kutatási területe.⁴² Az ezüst és cink-oxid nanorészecskék toxicitásának magyarázatára is az egyik legáltalánosabban elfogadott mechanizmus az ezüst-, illetve cink ionok kioldódásán, és a kioldódott ionok ROS képzésén alapul.^{43,44}

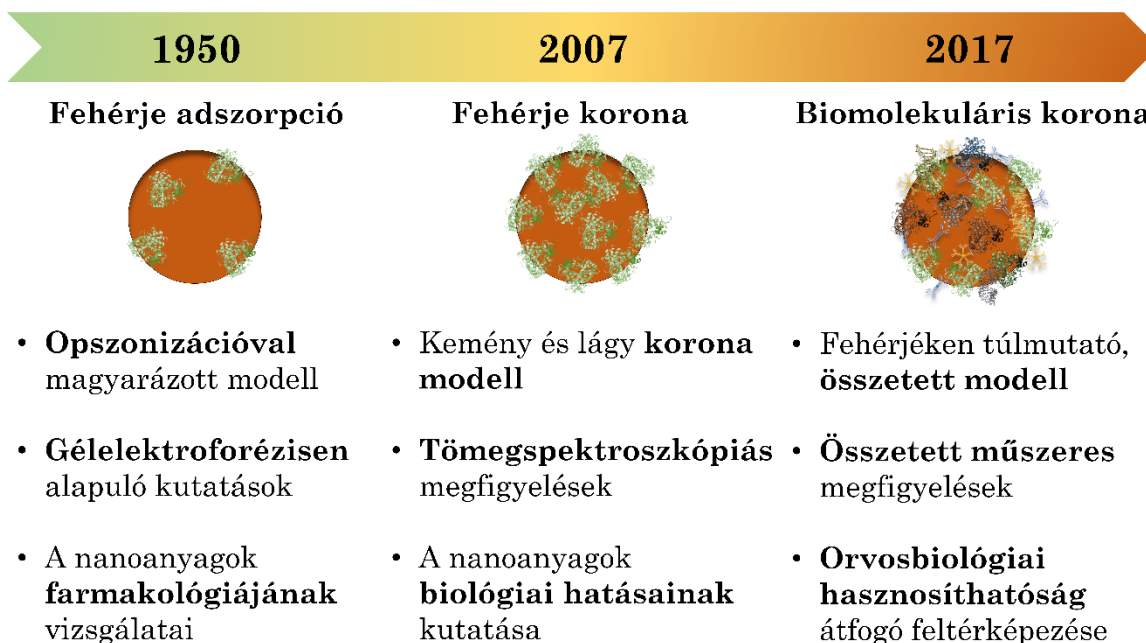
Noha a felsoroltak közül a negyedik csoport, azaz a felületi adszorpciós reakciók függenek a legkevésbé a nanoszerkezetek anyagi minőségétől és morfológiájától, biológiai szempontból talán mégis ezek a kölcsönhatások bírnak az egyik legnagyobb jelentőséggel. A felületi adszorpcióval számos esetben már a részecskék szintézisének stádiumában foglalkozunk, hiszen a megfelelő stabilizálószer segítségével a szintézis során befolyásolhatjuk a részecskék méretét és alakját,⁴⁵ illetve meghatározhatjuk a részecskék kolloidstabilitását (és ahogy a későbbiekben ezt részletesen taglalni fogjuk, a kolloidstabilitás a toxicitás szempontjából alapvető fontosságú). A felületre adszorbeált anyagok töltése is befolyásolni képes az egyébként azonos nanorészecskék hatását. Érdemes megjegyezni, hogy a toxicitással foglalkozó kutatások ilyenkor sokszor pontatlanul a részecskék felületi töltését emlegetik, valójában azonban a felületen kialakuló diffúz kettős réteg (vagy bizonyos esetekben a felületre adszorbeálódott anyagok) töltése a meghatározó.^{39,46–48} Minden esetre általánosan levonható következtetés, hogy pozitív „felületi” töltéssel rendelkező nanorészecskék nagyobb toxicitással rendelkeznek, mint a semleges és negatív változataik, ami azzal magyarázható, hogy könnyebben tudnak a sejtmembránok negatív töltésű glikoproteinjeihez koordinálódni, és így nagyobb hatékonysággal jutnak be a sejtek belsejébe.³⁹

A biológiai és környezeti rendszerek kapcsán meg kell említenünk egy további, a felületi adszorpcióhoz köthető folyamatot. A földi élet minden területén alapvető fontosságúak a különböző makromolekulák, ezek pedig a nano-határfelületeken változatos adszorpciós rétegeket

képesek kialakítani, amelyek a nanorészecskék kommunikációját az élő szervezetekkel alapjaiban megváltoztatják. Ezt a folyamatot koronaképződésnek nevezzük.

2.1.2. Nanorészecske koronák

Az előző fejezetben bemutatott kölcsönhatás típusok közül talán a részecskék felületén lejátszódó adszorpciós folyamatok bírnak a legnagyobb jelentőséggel. Mindamellet, hogy az adszorbeálódó biomolekulák nagymértékben befolyásolják a környezet viselkedését a nanoméretű objektumokkal szemben, hatással lehetnek a nanoanyagok reakciókészségére és kolloidstabilitására is. A következőkben ezen folyamatok megismerésének történetét (2. ábra) és jelentőségét szeretnénk bemutatni.⁴⁹



2. ábra A korona modell fejlődése

A megfigyelés, amely alapján a szervezet fehérjei képesek a nanorészecskék felszínére adszorbeálódni nem újszerű, hiszen a témához kapcsolódó első kutatások már az 50-es, 60-as évek tájékán folytak.^{50,51} Ezek elsősorban gélelektroforézist használó, fehérje adszorpción alapuló vizsgálatok voltak és az intravénásan adagolt nanorészecskék véráramban töltött keringési idejének meghosszabbítására irányultak.⁴⁹ Az eredmények a mai napig nagy jelentőséggel bírnak, ugyanakkor nem mutattak túl a fehérjék adszorpciójának jellemzésén, amit az opszonizációval analóg módon magyaráztak. Opszonizációnak nevezzük az immunrendszer azon stratégiáját, amely során a szervezet úgynevezett opszonin molekulák (például antigének) segítségével

megjelöli a patogén anyagokat a megfelelő karakterisztikus epitóp helyeken, ezáltal serkentve a megjelölt objektumok makrofág sejtek által történő bekebelezését.

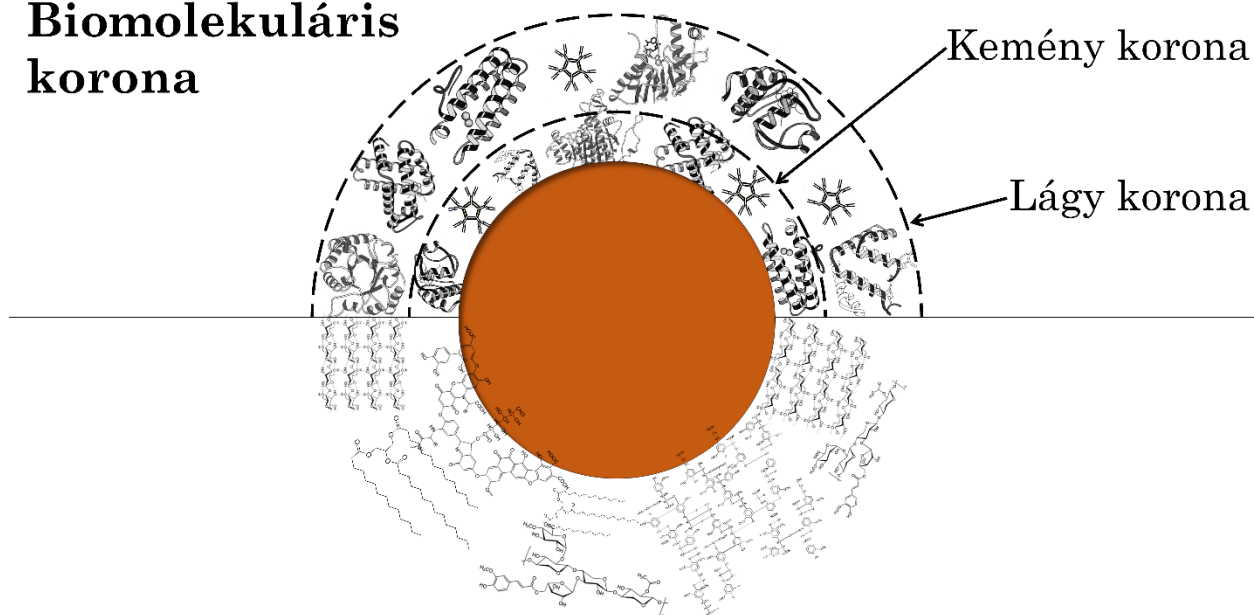
A 2000-es évek során, főként a nagy áteresztőképességű tömegspektrometriai kutatásoknak köszönhetően, ezek a megfigyelések a fehérje korona elméletté nőttek ki magukat.⁴⁹ A fehérje korona elmélet legjelentősebb megfigyelése a kemény (*hard*) és lágy (*soft*) koronák létezése volt. A felfedezés azonban megosztotta a tudományos közösséget; a legtöbb értekezés egyetértett a szerkezetükkel kapcsolatban, miszerint a kemény korona egy kompakt képződmény, ami nagy affinitással kapcsolódó fehérjéket tartalmaz a nanorészecskék felületén, amíg a lágy korona egy lazább, dinamikusan változó és nagyobb méretű szerkezet, amiben a fehérje-fehérje kölcsönhatások sokkal nagyobb jelentőségűek, mint a kemény korona esetében, ahol a részecske fehérje kapcsolatok kerülnek előtérbe. A kemény és lágy koronák viszonyáról azonban az elméletek már nem értettek egyet minden esetben; egyes kutatások alapján a nanoanyagok biológiai közeggel történő érintkezésekor először lágy korona alakul ki, ami az idővel alakul kemény koronává, más szerzők szerint pedig a kemény és lágy koronák mag-héj szerűen egymás mellett létező, és megfelelő eszközökkel egymástól függetlenül vizsgálható képződmények.^{52,53}

Napjaink legfrissebb kutatási eredményei rávilágítottak arra, hogy a koronák kialakulásában nem pusztán fehérjék, hanem egyéb biomolekulák (például aminosavak, cukrok, hormonok, lipidek és különféle metabolitok) is aktívan részt vehetnek, emiatt célszerű a fehérje korona elnevezést biomolekuláris koronára cserélni.⁴⁹ Fontos megfigyelés továbbá, hogy a biomolekuláris korona kialakulása egyfajta biológiai identitást kölcsönöz a szervezetbe kerülő nanoanyagoknak, amely specifikus kölcsönhatások formájában nyilvánul meg. Ezek a kölcsönhatások döntik el, hogy a szervezet milyen elsődleges válaszreakcióval reagál a részecskék megjelenésére. A témában megjelenő legújabb, kémiai és biológiai eszközöket is felhasználó kutatások ezen kölcsönhatások molekuláris szintű megfigyelésére és megértésére irányulnak.^{54,55}

A természet nagymértékű diverzitása is megannyi lehetőséget kínál a nanoméretű rendszerek bioreleváns kölcsönhatásai tekintetében. Újabb kutatások rávilágítottak arra, hogy az élő szervezeteknél leírt biomolekuláris korona analógiaként definiálhatjuk az úgynevezett öko-koronát is.⁵⁶ Az öko-koronák meghatározóan természetes szerves anyagokból, illetve olyan egyéb szerves és szervetlen vegyületekből épülnek fel, amelyeket a természetben előforduló mikroorganizmusok és növények választanak ki; ezeket a szakirodalom extracelluláris polimer vegyületekként (EPS, *extracellular polymeric substance*) tartja számon.⁵⁷ Az EPS-ek kémiai

összetételüket tekintve fehérjék, poliszacharidok, zsírok/olajok, nukleinsavak és szervetlen alapú vegyületek keverékei. Öko-korona alkotó lehet például a cellulóz, hemicellulóz, valamint különböző csersav és huminsav származékok is. A biomolekuláris és öko-koronák szemléltetése a 3. ábrán látható.

Biomolekuláris korona



Öko-korona

3. ábra Biomolekuláris és öko-koronák szemléltetése

Az irodalmi eredményeket összegezve elmondható, hogy a bio-nano kölcsönhatások értelmezéséhez elengedhetetlen a környezet és a nanoanyagok között kialakuló speciális határfelületen lejátszódó folyamatok pontosabb ismerete és komplex értelmezése annak érdekében, hogy a megszerzett ismertekből szabályozható, biztonságosan alkalmazható aktív eszközöket és technológiákat formálhassunk. A következő fejezetben néhány alapvető technikát említünk meg, amelyek segítségével elsődleges *in vitro* információkat nyerhetünk a nanoméretű szerkezetek toxicitásával kapcsolatban.

2.1.3. Toxicitás vizsgálatok és jelentőségük

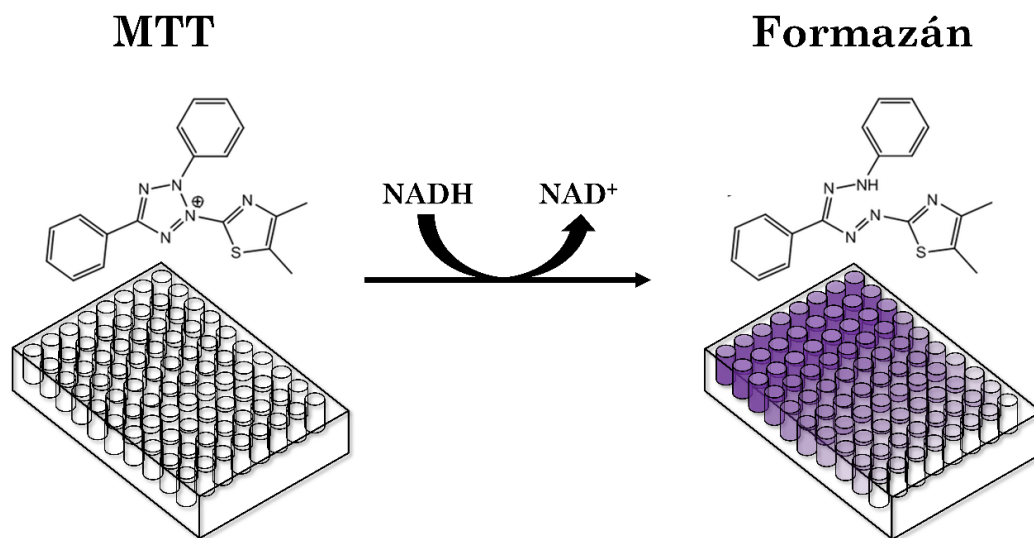
A sejtenyészet alapú esszék olyan alapvető mérések, amelyek során különböző anyagok sejtprolifrációra gyakorolt hatását, illetve direkt toxicitását vizsgálhatjuk laboratóriumi körülmények között. Ezek az esszék széles körben alkalmazhatók olyan receptor kölcsönhatások és jelátviteli folyamatok megfigyelésére is, amelyek meghatározott génexpresszióval, sejtes elem

átrendeződéssel, vagy például sejtorganellek funkciók megváltozásával járhatnak.⁵⁸ A vizsgálatok alapját olyan változások adják, amelyek optikai úton detektálhatók, rendszerint valamilyen színreakciót használunk a sejtek életképességének felmérésére. A vizsgálatok fizikai háttere a Lambert-Beer törvény szerint értelmezhető, amely a fényelnyelés azon szakaszára érvényes, ahol az abszorbanca és a koncentráció lineárisan függenek egymástól:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon c l$$

Ahol A az abszorbanca, I_0 a besugárzott monokróm fény intenzitása, I a transzmittált fény intenzitása, ϵ az adott anyagi minőségre jellemző moláris extinkciós koefficiens (m^2/mol), c a mért anyag koncentrációja (mol/dm^3) és l az elnyelő anyagban megtett fényút (küvetta) hossza (m).⁵⁹ A kísérletek során a sejteket megfelelő számú és térfogatú lyukakat (*well*) tartalmazó, a látható fény számára áttetsző lemezekre (*plate*) osztjuk ki, ahol az adott sejtvonalak számára megfelelő növesztési és kezelési protokollok után az eredményeket külön erre a célra fejlesztett spektrométerek (ún. *plate reader*) segítségével olvashatjuk le.

Az MTT (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid) redukciós esszé az első, 96-lyukú lemezre optimalizált, nagy áteresztőképességű homogén sejtviabilitási technika.⁶⁰ Jelentőségét a módszert felhasználó több ezer megjelent publikáció is jól szemlélteti, amelyek között jelentős mennyiségű, új, nanotoxicitási tanulmány is olvasható. Folyamatosan jelennek meg publikációk, amelyekben olyan nanoanyagok toxicitását vizsgálják MTT esszé segítségével, mint például szerves lipid alapú hatóanyag hordozók, szervetlen szilika alapú nanorészecskék, vagy olyan fém és fém-oxid alapú nanoanyagok mint az arany, ezüst, vas, cink-oxid, vagy például hafnium-oxid.^{61–65} A vizsgálatok alapja az MTT festékmolekulák redukcióján alapul (4. ábra).



4. ábra Az MTT esszé mechanizmusa

A redukció biokémiai háttere nem teljesen tisztázott. A ma legáltalánosabban elfogadott elképzelés szerint NADH, vagy ahhoz hasonló biomolekulák elektrontranszferén keresztül játszódik le a színreakció, régebbi elképzelések azonban mitokondriális aktivitáshoz kötötték azt.⁵⁸ A redukció során lila színű formazán kristályok keletkeznek, amelyek elnyelési maximuma 570 nm körül van, a szín intenzitása pedig az élő sejtek mennyiségével arányos. A vízben oldhatatlan kristályokat többnyire egyéb szerves oldószerben (dimetil-szulfoxid, dimetil-formamid), vagy felületaktív anyagok segítségével (nátrium-dodecil-szulfát) oldjuk fel, majd a kapott oldatok elnyelését detektáljuk.⁵⁸ A viabilitást ezután egy olyan százalékos arányszámmal jellemezzük, amelyet a kezelt minta fényelnyelésének és egy kezeletlen kontroll minta (100%-os viabilitás) fényelnyelésének hányadosaként definiálhatunk. A mérési adatok interpolációjából megkaphatunk bizonyos nevezetes, a kísérleti rendszerre állandó koncentrációkat, mint például IC₅₀ értékeket, amelyek azt a hatóanyag-koncentrációt jelölik, amelyek mellett a sejtviabilitás 50%-os.

A humán és állati sejtvonalak tetrazólium festék redukciós esszéihez hasonló módszerek a különböző baktériumok és gombák elleni antimikrobiális anyagok vizsgálatára kifejlesztett mikrodilúciós módszerek.⁶⁶ Mivel számos mikroba törzs növekedéséből olyan telepek keletkeznek, amelyek jelentős elnyeléssel rendelkeznek a látható fény tartományában, a viabilitást közvetlenül, egyéb reakció nélkül is vizsgálhatjuk. A tesztek legtöbbször a mikrobák növesztéséhez használt közegben különböznek, használhatunk például folyékony agart, vagy történeti okokból „húslevesként” (*broth*) emlegetett médiumokat. A mikrodilúciós tesztek során általánosan a MIC (*minimal inhibitory concentration*) koncentrációk meghatározása a cél, amely az a legkisebb

hatóanyag-koncentráció, amely képes a mikrobanövekedés teljes gátlására.⁶⁶ A legfrissebb kutatások között mikrodilúciós módszereket alkalmaztak réz-oxid nanorészecskék sebfertőtlenítő képességének jellemzésére, kitozánnal borított politejsav részecskék antimikrobiális hatóanyagleadásának kutatására, cink-oxid részecskék és antibiotikumok szinergista hatásának feltárására, vagy például nanoezüst és természetes fenolszármazékok egymást erősítő antimikrobiális hatásának értelmezésére.^{67–70}

A nanoanyagok és élő rendszerek kapcsolatát és annak vizsgálatát áttekintve látható, hogy egy nagyon összetett területről van szó, amely sokkal általánosabb kihatással van a mindennapi életre, mint azt elsőre gondolnánk. Habár a nanorészecskék pontos élettani hatásaira (jobbára az előzőknél jóval összetettebb) biológiai tesztek a legalkalmasabbak, a nanorészecskék bioreleváns viselkedése túlmutat az egyes tudományterületek határain, az átfogó ismeretekhez pedig olyan multidiszciplináris kutatások szükségesek, amelyek több tudományterületet érintve igyekeznek hidat képezni a nanotechnológiával foglalkozó megannyi ágazat között. Mivel a nanorészecskék különleges tulajdonságait a határfelületük szolgáltatja, így nem hanyagolhatjuk el a határfelületek eredeti tudományterületének, a kolloidikának a szemléletmódját.

2.2. Nanorészecskék kolloidstabilitása

2.2.1. Aggregáció

Folyadék közegben a nanorészecskék inkoherens diszperz rendszereket képeznek. Inkoherens diszperz rendszereknek azokat a kolloidokat nevezzük, amelyek egynemű (diszperziós) közegében fizikailag és kémiaiilag különböző (diszperz) részecskék vannak szétosztatva. A diszpergált részecskék mérete alapján beszélhetünk kolloid diszperz, és durva diszperz rendszerekről. A szilárd/folyadék határfelület (például nanorészecske kolloidok) mentén kialakuló kolloid diszperz rendszereket szoloknak, a durva diszperz rendszereket pedig szuszpenzióknak nevezzük.¹¹ Klasszikus értelemben a szolokat és a szuszpenziókat az különbözteti meg egymástól, hogy a szolok fénymikroszkóppal homogénnek tűnnek (a részecskék nagyjából 1 és 500 nm közöttiek), míg a szuszpenziók akár szemmel láthatóan is zavarosak (500 nm-nél nagyobb elemek felett).¹¹ Ezek a definíciók azonban az utóbbi időben meglehetősen összemosódtak, és a szakirodalom sok esetben szinonimákként tekint rájuk.^{71,72} Ez egyfelől köszönhető annak, hogy a szolok és szuszpenziók sok szempontból hasonlítanak egymásra, ugyanakkor azt a jelenséget is meg kell említenünk, hogy a nanotechnológia multidiszciplináris volta miatt az egyes

tudományterületek sokszor egymás ismerete nélkül vonják le tudományos következtetéseiket, ami esetenként „a kerék újrafeltalálásával” jár.⁷³ A későbbiekben igyekszünk az elnevezéseket következetesen használni, azonban a nanorészecske aggregáció tárgyalásakor az aggregátumok méretének növekedése miatt ezek átfedhetnek egymással.

Mivel a földi élethez nélkülözhetetlen biokémiai folyamatok vizes közegben mennek végbe, a nanotechnológia biológiai vonatkozásai kapcsán elengedhetetlen a részecskéket kolloidkémiai szempontból is megvizsgálni. Ahogy ezt korábban említettük, a nanoméretű szerkezetek nagy felület/térfogat aránya nagy felületi energiával jár.⁷⁴⁻⁷⁶ Ez a megemelkedett energiaszint azonban termodinamikailag kedvezőtlen, így az energiacsökkentésre irányuló törekvés következtében (azaz a felület csökkentése érdekében) a részecskék összetapadhatnak, amit aggregációnak nevezünk.¹¹ Biológiai és környezeti szempontból megkülönböztethetjük a homoaggregáció és a heteroaggregáció folyamatát.¹⁰ Homoaggregációkor hasonló objektumok, megegyező nanorészecskék kötődéséről beszélünk, amit laboratóriumi körülmények között viszonylag egyszerűen mérhetünk, míg a heteroaggregáció egy sokkal komplexebb jelenség, ami a természetbe kikerülő nanorészecskék esetén sokkal nagyobb jelentőséggel bírhat, hiszen a kijutó nanoszerkezetek az ott egyébként is jelenlévő, anyagi minőségükben és morfológiájukban különböző nanoanyagokkal is kölcsönhatásba léphetnek. Az aggregátumok kialakulásának valószínűségét a tapadási koefficienssel (α) jellemezhetjük, ahol $\alpha=1$ esetén a részecskeütközések 100%-a végződik összetapadással, $\alpha=0,5$ esetén viszont a találkozások fele, stb. Ha a tapadási koefficiens 1, azaz minden részecskeütközés tapadással jár, dendrimer szerkezetű aggregátumok jönnek létre, míg alacsonyabb értékek esetén szorosabb szerveződésű aggregátumokat tapasztalhatunk.⁷⁷ Az aggregátumokat tovább jellemezhetjük a szerkezetük alapján, amire a fraktáldimenziójukat (D_f) használjuk, amely az 1 (vonal) és 3 (gömb) euklideszi dimenziók közötti értéket vehet fel. A laboratóriumban jól kontrollált homoaggregátumok általában kikövetkeztethető fraktáltulajdonságokkal rendelkeznek, a környezetben kialakuló heteroaggregátumok azonban rendszerint olyan természetes fraktálokat képeznek, amelyekben nehéz az aggregációs viszonyok értelmezése.¹⁰ Mivel az aggregáció a nanorészecskék számos tulajdonságát befolyásolhatja, a kolloidstabilitást kialakító törvényszerűségek ismerete elengedhetetlen a biztonságos felhasználás érdekében.

A kolloidkémia a nanorészecskék aggregációját, pontosabban a rendszerek kolloidstabilitását legáltalánosabban a megalkotóiról (*B. V. Derjaguin, L. D. Landau, E. J. W.*

Verwey és *J. T. G. Overbeek*) elnevezett DLVO elmélet szerint értelmezi.⁷⁸ A klasszikus DLVO elmélet értelmében a részecskék kolloidstabilitását két ellentétes erő viszonya határozza meg; a köztük kialakuló van der Waals vonzó kölcsönhatások (V_{vdW}) és a részecskék körül kialakuló szolvát burok töltéséből származó elektrosztatikus taszító erők (V_{ESz}) eredője. A van der Waals kölcsönhatásokat legegyszerűbben (vákuumban) lévő azonos részecskékre felírva, a

$$V_{vdW} = -A \frac{a}{12h}$$

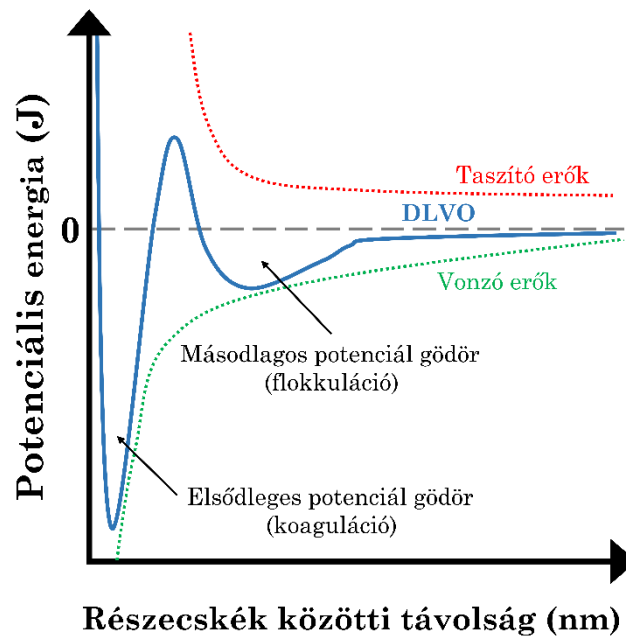
egyenlet alapján értelmezhetjük, ahol A (J) az úgynevezett Hamaker állandó, a (m) a részecskék sugara és h (m) a részecskék közötti távolság.⁷⁸ A Hamaker állandó nagysága a részecskék között fellépő van der Waals kölcsönhatások erősségével arányos, és az

$$A = \pi^2 \rho^2 C$$

összefüggés alapján definiálhatjuk, ahol ρ a részecskék darabszám koncentrációja ($1/m^3$), C ($J\ m^6$) pedig a London-féle diszperziós állandó, ami az indukált dipólus kölcsönhatásokhoz köthető.⁷⁹ Az összefüggés másik tagját képező elektrosztatikus taszítást a részecskék körül kialakuló elektromos kettős rétegekből (EDL) származtathatjuk, amelyeket a következő fejezetben részletesebben tárgyaljuk:

$$V_{ESz} = \frac{2 \pi a^2}{2a} \int_h^{\infty} v_R dx$$

Az egyenlet az azonos gömb alakú részecskék közötti kettős réteg kölcsönhatást írja le, ahol h a részecskék felületei közötti távolság és v_R az egységnyi felületre jutó potenciális energia.⁷⁸ Ezek az erők jól látható módon függenek a részecskék távolságától, a kolloidok stabilitásának egy általános esete pedig az 5. ábrán látható potenciálgörbe szerint értelmezhető:



5. ábra Kolloid rendszerek stabilitása a DLVO elmélet alapján

A vonzó és taszító erők potenciális energiájának összegéből kialakuló DLVO görbét a kölcsönható részecskék távolságának függvényében ábrázolva, két különböző mélységű potenciálgödört figyelhetünk meg, amelyeket egy lokális maximum választ el egymástól. A sekélyebb, lokális minimum a reverzibilis aggregációhoz (flokkulációhoz) köthető, ameddig a mélyebb gödör az irreverzibilis aggregációt (koagulációt) jelenti. A hosszútávú kolloidstabilitás akkor valósulhat meg, ha a részecskék nem juthatnak el az irreverzibilis aggregáció energiaszintjére, azaz a két minimum közötti potenciálgát elég magas.

A valóságban a nanorészecskék aggregációs viselkedése sok esetben meghaladhatja a fent bemutatott klasszikus görbét, például bizonyos nagy stabilitású, polielektrolittal borított nanorészecskék esetén elérhető az elsődleges minimum megszűnése, ilyenkor a részecskék közötti vonzás egy másodlagos minimumban összpontosul.^{80,81} Ezeknek a komplexebb folyamatoknak a leírására érdemes a kiterjesztett XDLVO (*extended DLVO*) megközelítést alkalmazni. Az XDLVO figyelembe vesz olyan kölcsönhatásokat is, mint az egyállású elektron spinekből kialakuló mágneses vonzás (V_M), a vizes közegek hidrogénkötéseinek felszakadásából származó, entrópiagátolt hidrofób erők (V_{Hf}), a diszperziós közeg ionerősségével összefüggő ozmotikus erők (V_{Osm}), illetve a részecskék felületére adszorbeálódott molekulák által előidézett szterikus taszítás (V_{Szer}) és a hídképző vonzó kölcsönhatások (V_{Hid}).^{82–85}

A DLVO elmélet egy meglehetősen összetett, és számos jelentős fizikai kémiai paraméter figyelembevételével kialakított modell, amelynek az egzakt tárgyalása hosszabb elemzést érdemel, mint amit a disszertáció korlátai megengednek. A témához kapcsolódóan kiváló monográfiák olvashatók, mint például Elimelech „*Particle deposition and aggregation: Measurement, modeling, and simulation*” és Israelachvili „*Intermolecular and surface forces*” című kiadványai, amelyek részletesen tárgyalják a különböző paraméterek szerepét és kísérleti meghatározásainak lehetőségét.^{78,79}

Habár a valóság sokszor összetettebb, az alap elmélet feltevése továbbra is fennáll: megfelelően erős taszító kölcsönhatásokat kell kialakítanunk a részecskék között. A diszperz részecskék megfelelő stabilitását klasszikusan az Ostwald-Buzágh-féle kontinuitási elv szerint úgy érhetjük el, ha a részecskék felületén egy olyan adszorpciós réteget hozunk létre, amely minél folytonosabb átmenetet képes létrehozni a szilárd/folyadék határfelületen.¹¹ A stabilitást jelentő hatások szempontjából a kialakított adszorpciós rétegeket elektrosztatikus, sztérikus, illetve elektrosztérikus csoportokba sorolhatjuk.

Elektrosztatikus stabilizálás esetén az adszorpciós réteg töltéssel rendelkező kismolekulákból, összetett ionokból, illetve bizonyos esetekben polielektrolitokból áll,⁸⁶ amelyek töltése elektrosztatikus taszítást eredményez a részecskék között. Az elektrosztatikus stabilitás kialakulását és mérését a következő fejezetben részletesebben is tárgyalni fogjuk, de röviden, a taszítás maximalizálásának három fő kritériuma van: az első a nagy zéta-potenciál, a második az alacsony ionerősség, a harmadik pedig a rendszerben lévő ionok alacsony értékűsége.⁸¹ Sztérikus stabilizálás esetében a részecskék felületére polimereket adszorbeálunk, amelyek saját kiterjedésük révén nem engedik a részecskéket túl közel kerülni egymáshoz. A hatékony sztérikus stabilizálásnak négy fő feltétele van: teljes borítottság elérése (alacsonyabb koncentrációk esetén hídkepződéssel kell számolnunk), erős kölcsönhatás a polimerláncok és a részecskefelület között, megfelelően vastag adszorpciós réteg, és a polimer megfelelő megválasztása, hogy a releváns körülmények között a borítás anyagi minősége és liofilitása biztosított maradjon.⁸¹ Végül a kettőt ötvöző elektrosztérikus stabilizáció esetén az előző két csoport tulajdonságait egyesítjük töltéssel rendelkező makromolekulák, úgynevezett polielektrolitok segítségével.

A nanorészecske diszperziók kolloidstabilitása egy meglehetősen összetett, biológiai vonatkozásokban sem elhanyagolható jelenség. Az ilyen kolloidok vizsgálata napjainkban legáltalánosabban fényszórás-vizsgáló berendezésekkel, főként dinamikus fényszórásméréssel

történik. Azonban számos kutatás alkalmával ezeket a műszereket nem megfelelő körültekintéssel használták, ezért érdemes megismerni az alapvető működésüket.

2.2.2. A dinamikus fényszórásmérés és zéta-potenciál jelentősége

A dinamikus fényszórásmérés (*Dynamic Light Scattering*, DLS) segítségével elsősorban szolok és szuszpenziók lebegő fázisának méreteloszlásáról kaphatunk statisztikát, de az ezekhez a mérésekhez használt műszerek rendszerint képesek a diszpergált részecskék zéta-potenciáljának, molekulatömegének, mikroreológiai tulajdonságainak, és egyéb jellemzőinek meghatározására is.

A DLS mérések alapját két alapelőfigyelés adja. Az első, hogy a folyadékokban található részecskék Brown mozgást végeznek, amelynek sebessége a Stokes-Einstein egyenlettel jellemezhető⁸⁷:

$$D = \frac{k T}{6 \pi \eta r}$$

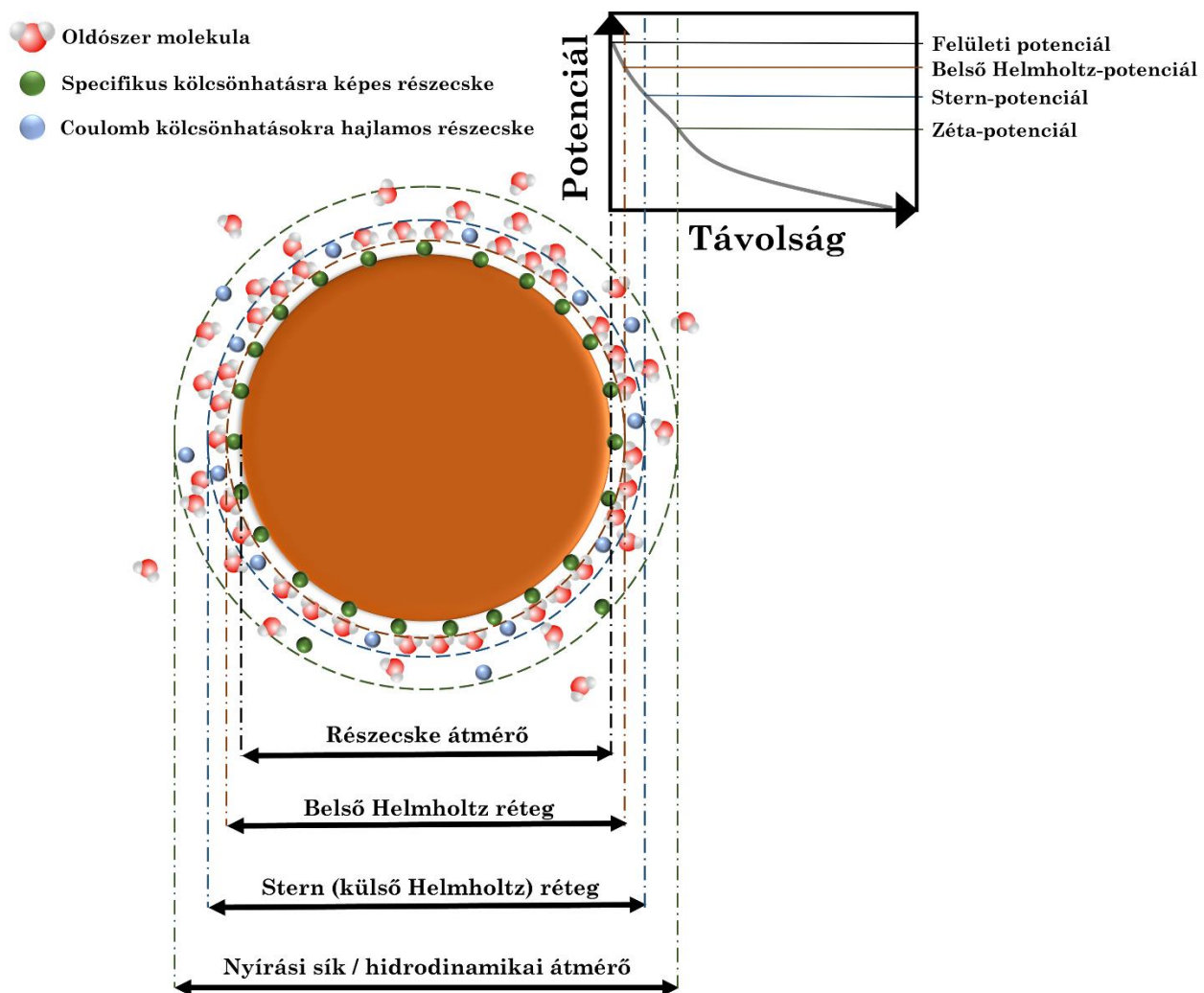
Ahol D a translációs diffúziós koefficiens (m^2/s), k (J/K) a Boltzmann állandó, T (K) az abszolút hőmérséklet, η (Pa s) a közeg dinamikus viszkozitása és r (m) a részecskék sugara. A translációs diffúziós koefficiens lényegében a Brown-mozgás „sebességét” jelenti, D és r fordított arányosságából pedig látható, hogy a kisebb részecskék gyorsabban mozognak, mint a nagyok.

A második meglátás az, hogy ha az elektromágneses sugárzás akkora objektummal találkozik, amelynek mérete a sugárzás hullámhosszánál kisebb (Rayleigh tartomány), vagy azzal összemérhető (Mie tartomány), a részecskére eső fotonok szóródni fognak, interferenciát idézve elő¹¹. Szubmikronos részecskék esetén a fényszórás jelensége a látható fény hullámhossztartományában könnyen vizsgálható.

Dinamikus fényszórásmérés esetén a műszer lézerforrásából beeső nyaláb intenzitásváltozását detektáljuk az idő előrehaladtával, amelynek változása a szolvatált részecskék Brown-mozgásától függ és megadja a minta úgynevezett korrelációs (hasonlósági) függvényét. A korrelációs függvény egy 1-ből 0-ba csökkenő függvény, amelynél 1 jelenti a kiindulási pont fényszórásával azonos állapotot, a 0 pedig az attól teljesen különbözőt. A Brown mozgás sebessége (tehát a részecskeméret) meghatározza a korrelációs függvény meredekségét, a minta modalitása és diszperzitása pedig a függvény alakját módosíthatja. A korrelációs függvény kumuláns analíziséből a műszer meghatározza a vizsgált minta átlagos hidrodinamikai átmérőjét. Az átlagos hidrodinamikai átmérő a DLS alapú méretanalízis legalapvetőbb és legstabilabb számértéke, amely

a kolloid rendszerben szolvatálódott egységek (például szabad részecskék és aggregátumok) méretével arányos⁸⁸. Nanorészecske szuszpenziók esetén a primer részecskeméret ismeretében, a két számérték összehasonlításával információt nyerhetünk a rendszer aggregációjának mértékéről.

A részecskéket körülvevő szolvát (hidrát) burkokat a folyadékközeg olyan elemei alkotják, amelyek valamilyen vonzó kölcsönhatás révén megváltozott mozgásállapottal rendelkeznek és együtt haladnak a részecskékkel. A burok szerkezete általánosan a diffúz kettős réteg (*electrical double layer*, EDL) elmélettel írható le, amelyet az 6. ábra szemléltet.



6. ábra Az elektromos kettős réteg sematikus ábrázolása

A klasszikus EDL értelmezés alapján a kettős réteg belső felét olyan molekulák/ionok alkotják, amelyek valamilyen erős kölcsönhatás (főként felületi adszorpció) révén szorosan kapcsolódnak a részecske határfelületéhez, a kettős réteg külső részét pedig a folyadékfázis olyan

elemei alkotják, amelyek csak gyengébb kölcsönhatásokkal (pl. van der Waals erők) kötődnek a szilárd határfelülethez, vagy a Stern réteg alkotóelemeihez. Az újabb kísérleti eredmények azonban rávilágítottak arra, hogy a pontosabb értelmezés érdekében a legtöbb esetben kifinomultabb elképzelésekre van szükség.⁷⁸ A korszerű megközelítések a Stern réteget két alegységre választva értelmezik: megkülönböztethetjük a belső, illetve külső Helmholtz rétegeket, amelyeket a belső Helmholtz sík választ el egymástól. A belső Helmholtz réteget a szilárd felszín és a belső Helmholtz sík határolják, és olyan molekulákból és ionokból állnak, amelyek kémiai affinitást mutatnak a szilárd felület irányába és rendszerint specifikus adszorpció útján kapcsolódnak a felszínhez, míg a külső Helmholtz rétegben olyan részecskék helyezkednek el, amelyek specifikus affinitás hiányában, Coulomb kölcsönhatások révén vonzódnak a felszínhez. A Stern (külső Helmholtz) síkon túl található a diffúz réteg, amelyben a folyadékközeg részecskéi már gyengébb, főként elektrosztatikus vonzás révén kapcsolódnak a felszínhez, a réteg határát pedig nyírási síknak nevezzük.⁸⁹ Az EDL minden rétegének határán nevezetes potenciálokat definiálhatunk (6. ábra), a részecskék aggregációjának vizsgálata szempontjából azonban a legjelentősebb a nyírási síkon mérhető zéta-potenciál.

A zéta-potenciál (ζ -potenciál) nagy jelentőséggel bír a nanorészecske kolloidok stabilitásának jellemzése során is. Az általunk használt mérési módszer lézer-Doppler-elektroforézis alapján történik, ami azzal jár, hogy a műszer feszültséget kapcsol a mérendő, kapillárisba töltött szuszpenzióra, aminek hatására a töltött részecskék elindulnak valamelyik pólus irányába.⁸⁸ Amikor a részecske áthalad a lézernyalábon, akkor a mozgásából adódó Doppler-effektus miatt a szóródó fény (a mozgás irányától függően) vörös- vagy kékeltolódást szenved, megváltozik a frekvenciája, emiatt változik a szórt fény intenzitása, amiből meghatározható az úgynevezett elektroforetikus mobilitás (u_e), amely az elektroforézis hatására mozgó részecske sebességének (v_e) és az elektromos erőter nagyságának (E) a hányadosaként definiálható. A kísérleteink során használt műszer az elektroforetikus mobilitásból a Hückel egyenlet alapján számol zéta-potenciált^{78,88}:

$$u_e = \frac{2 \varepsilon \zeta}{3 \eta} f(\kappa a)$$

Ahol ε a közeg dielektromos állandója, ζ a zéta-potenciál, η a közeg viszkozitása, $f(\kappa a)$ pedig egy alakfüggő függvény, amely gömbszerű részecskék esetén 1-től 1,5-ig nőhet, ahogy κa 0-ból a végtelenbe tart; κa a részecskék Debye-Hückel paraméterének, illetve átmérőjének a

szorzata, és az EDL részecskeméretéhez viszonyított vastagságát szemlélteti.⁷⁸ Ha $\kappa a \gg 1$, a diffúz réteg sokkal vékonyabb, mint a részecskeátmérő, $\kappa a \ll 1$ esetén pedig jóval vastagabb. A gyakorlatban $f(\kappa a)$ értékét bizonyos becslések alapján határozzuk meg, például a kísérleti rendszerünk vizes közegű kísérleteihez ajánlott módszer az úgynevezett Smoluchowski közelítés, amely a korrekciós faktor értékét 1,5-ként definiálja.⁸⁸ Habár a zéta-potenciál egy kézzel fogható és könnyen értelmezhető adat, a lézer-Doppler-elektroforézisen alapuló műszerek sok feltételezésen és egyszerűsítésen keresztül jutnak el a ζ -potenciál adatokig, ezért bizonyos esetekben (például nem gömbalakú részecskékénél) érdemes lehet az elektroforetikus mobilitás adatokra szorítkozni.

A kolloid rendszerek elektrosztatikus stabilitását túlnyomó részt a zéta-potenciál határozza meg. Minél nagyobb a ζ -potenciál értéke, annál nagyobb a részecskék között fellépő elektrosztatikus taszítás. Habár általános törvényszerűségeket nem fogalmazhatunk meg, a tapasztalatok azt mutatják, hogy tisztán elektrosztatikusan stabilizált rendszerek esetén a stabilitási határ valahol ± 30 mV körül van; közönséges körülmények között -30 mV alatt és $+30$ mV felett mondhatjuk el egy vizes közegű rendszerről, hogy kolloidálisan stabil, míg ezalatt a taszító kölcsönhatások nem feltétlenül elég erősek ahhoz, hogy a részecskék közötti vonzó kölcsönhatásokat ellensúlyozhassák. Fontos figyelembe venni azonban, hogy ez pusztán egy általános megfigyeléseken alapuló koncepció és számos olyan rendszer létezik, amely ezalatt az elméleti határ alatt is erőteljes stabilitást mutat.⁹⁰

A DLS kísérletek látszólagos egyszerűsége miatt a módszer egyre elterjedtebb a nano-bio kutatásokban, azonban megfelelő szemléletmód hiányában a legtöbb esetben csak igazoló jellegű, kiragadott mérési adatok közlésére használják.⁹¹ A mai napig rendszeres probléma, hogy a tanulmányok primer részecskeméret meghatározásra használják a DLS eredményeket, amelyet a korrelációs függvények analíziséből származó méreteloszlási diagramok (PSD - *particle size distribution*) valamelyikének önkényes bemutatásával igazolják.^{92,93} Habár egy nagyfokú stabilitást és monodiszperzitást mutató minta esetében ezek a PSD-k valóban hasonló eredményeket mutatnak a primer részecskék méretével, az esetek jelentős részében ezek a tulajdonságok eltérnek az ideálistól. Erősen polidiszperz, illetve nagyfokú aggregáltságot mutató minták esetén ezek a diagramok pontatlanok lehetnek, vagy akár teljesen fals eredményeket mutathatnak.⁸⁷ Az ezekhez hasonló félreértések elkerülése érdekében fontos a dinamikus

fényszórás alapjainak ismerete, és a módszer előnyeinek és korlátjainak figyelembevétele a határterületi kutatások során.

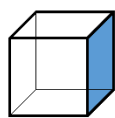
2.3. Ezüst nanorészecskék

2.3.1. Ezüst nanorészecskék jelentősége és előállítása

Az orvosbiológiai kutatások szempontjából az ezüst nanorészecskék talán a legnagyobb jelentőségű szervetlen nanoszerkezetek. Ez annak köszönhető, hogy a nanoezüst különleges optikai és elektromos tulajdonságai, valamint katalitikus hatása mellett kiváló antimikrobiális és citotoxikus aktivitással is bír.⁹⁴⁻¹⁰⁰ Ez többek között annak köszönhető, hogy a 2.1.2.-es fejezetben bemutatott biológiai kölcsönhatás-csoportok mindegyike megvalósul, emiatt nem, vagy csak igen speciális esetekben tud valós rezisztencia kialakulni az ezüst nanorészecskékkel szemben.

Az ezüst nanorészecskék hatásmechanizmusainak legáltalánosabban taglalt módszere az úgynevezett „Trójai faló” mechanizmus, amelynek értelmében a nanorészecskéket hordozóknak tekintjük, és a felületi oxidáció révén leváló ezüst ionok (Ag^+), mint hatóanyagok hatásait tapasztaltuk. Az Ag^+ ionok antibakteriális hatása mögött álló okok egyike, hogy nagy affinitással tudnak kötődni foszfát, karboxil, amino és szulfhidril csoportokhoz, így számos fontos makromolekulával (pl. nukleinsavakkal, fehérjékkel) képesek kölcsönhatásba lépni.¹⁰¹ Más kutatások szerint az ezüst ionok képesek a sejtmembránokkal elektrosztatikus kölcsönhatásba lépni, amely során depolarizálják azokat, H^+ szivárgást eredményezve.¹⁰² Az ion kioldódás harmadik következménye egyúttal átvezet a felület által katalizált kémiai reakciók tárgykörébe, ugyanis a biológiai rendszerekben felgyülemelő Ag^+ bizonyítottan ROS termelő folyamatokat indukálnak, oxidatív stresszt idézve elő.¹⁰³ Ez azonban nem csak ezüst ionok eredményeként jöhet létre, hiszen kutatási eredmények alapján elmondható, hogy a szinglet oxigén keletkezését olyan faktorok is befolyásolják, mint a részecskék alakja, aminek a háttérben a morfológiát kialakító eltérő kristályszerkezetek állnak.¹⁰⁴ Ezek jellemzésére egy, a kristálytanban használt jelölésmódot, a Miller-indexeket használunk, melynek segítségével a háromdimenziós rácssík-seregeket számhármassal jellemezhetjük, az indexek értékeit pedig az elemi cellában elhelyezkedő atomok helyzete határozza meg. A 7. ábrán szemléltetésként néhány, a nanoezüstre jellemző részecskealak látható, amelyekben a hozzájuk tartozó Miller-indexeket különböző színek jelölik.¹⁰⁵ Érdeemes továbbá megjegyezni, hogy ezek az alakzatok idealizáltak és a valóságban kialakuló részecskék rendszerint eltérnek ezektől, az eltérések legtöbbször lapilleszkedési pontokban és hibahelyeken alakulnak ki.¹⁰⁶

Miller index



(100)

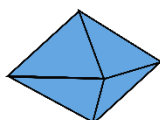


(110)



(111)

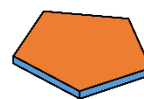
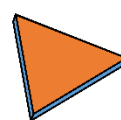
Jellemző ideális részecske alakok



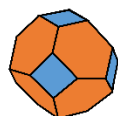
Kettős piramis



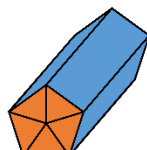
Oktaéder



Három és ötszögletű lapok

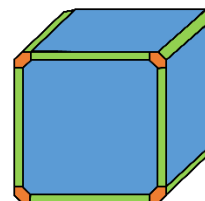


Csonka
oktaéder



Pentagonális
szál

Valós kocka alakú részecske kristályrácsa



7. ábra Ezüstre jellemző kristályrácsok és részecskealakok

A különböző alakú és méretű nanorészecskék eltérő arányokban tartalmaznak kis és nagy atomsűrűségű elemi cellákból felépülő kristályszakaszokat, amelyek eltérő biológiai aktivitással rendelkeznek. A gömböket, pálcikákat és háromszögeket felépítő síkseregek közül a nagy atomsűrűségű elemi cellák esetén, mint például az (111) Miller-indexű rácsok, nagyobb aktivitásra számíthatunk, mint az alacsonyabb atomsűrűségű (100), vagy (110) esetén.¹⁰⁷ Az alakon túl továbbá meg kell említenünk a részecskék méretének szerepét, és azt az általánosan elfogadott nézetet, hogy a részecskeméret csökkenésével nő a toxicitás, amit fajlagos felület növekedésével magyarázhatunk.^{5,6,108}

A részecskék méretének és morfológiájának kapcsán olyan folyamatok is jelentőséggel bírnak, amelyekhez jelen tudásunk szerint nem kötődnek egyéb kémiai reakciók, a toxicitás pusztán a nano-határfelületek és sejtorganellumok kölcsönhatásának eredménye. Ezek a folyamatok alkotják az induktív toxicitási mechanizmusok csoportját. Induktív toxicitás esetén a nanorészecskék organellumokra történő adhézioja befolyásolhatja a szervecskék alakját, destruktív mechanizmusokat idézve elő. A legjelentősebb induktív nanoezüst kölcsönhatás a mitokondriummal alakul ki, amelyet patkány májtól emberi tüdőig kimutattak már.^{109,110} Az adhézio eredményeként megváltozik a mitokondriumok Ca^{2+} permeabilitása, amely a citoskeleton átalakulásához, szélsőséges esetben pedig sejthalálhoz vezet. A mitokondriumon túl az ezüst nanorészecskék bizonyos membránfehérjék internalizációját is előidézhetik, amit például a

magzati umbilikális véna CD144-es cadherin fehérjéje kapcsán mutattak ki, amely a sejtek közötti adhézióért felelős, internalizációja pedig a szövet degradációját eredményezi.¹¹¹

Az utolsó csoportot képviselő, felületi adszorpciós reakciók kapcsán újfent megemlíthetjük a felületi stabilizálószer szerepét, ezek ugyanis módosíthatják az elektrosztatikus vonzás által kialakuló induktív toxicitási folyamatokat.¹¹¹ Továbbá ide sorolhatjuk a koronaképződést, amely specifikus, „ujjlenyomat-szerű” jellege miatt az ezüst nanorészecskékre adott biológiai válaszreakciókat is befolyásolhatja.^{112,113}

A nanoezüst erős, általános toxicitását jól szemlélteti, hogy a mai napig csak elszórva találkozhatunk olyan tudományos publikációkkal, amelyek ezüstre rezisztens mikrobákat mutatnának be. Ezüst rezisztenciát olyan esetekben mutattak ki, mint például egy *Pseudomonas stutzeri* törzs esetén, amelyet ezüstbányában találtak és a természetes élőhelye miatt vált rezisztensé az ezüst ionok jelenlétére.¹¹⁴ A kifejezetten nanorészecske elleni ellenállóképességre is kevés példa áll rendelkezésre. Azonosítottak egy *Pseudomonas aeruginosa* és pár *Escherichia coli* törzset is, amelyek ismételt érintkezés után nanorészecske aggregáció indukálása által tudtak rezisztenciát kialakítani.¹¹⁵ Az aggregáció hátterében a baktériumok ostorainak felépítésében résztvevő, globuláris flagellin fehérje termelődése állt, amelyek a részecskék felületére tapadtak erős felületi adhézió révén és aggregációt idéztek elő. Ez a hatás azonban a flagellin termelődés gátlásával megszüntethetőnek bizonyult.

A fentiekben bemutatott, változatos hatásmechanizmusoknak köszönhetően napjainkban már számos egészségügyi alkalmazás közkedvelt elemei az ezüst nanorészecskék. Találkozhatunk velük antimikrobiális és rákterápiás szerek hatóanyagaiként,^{116–120} illetve szerepük van az orvosi analitika és képalkotás területein is.^{121–123} A megfelelő hatékonyság elérésének, és a rezisztencia elkerülésének érdekében azonban speciálisan a konkrét feladatra alakított ezüst nanorészecskék szintézisére van szükség.

Az ezüst nanorészecskék szintézisekor az egyéb nanoméretű szerkezetek előállításánál általánosan elfogadott megközelítések érvényesülnek. Ezeket a megközelítéseket a szemcseméret-csökkentésén alapuló *top-down* (felülről-lefelé), illetve a kisebb alkotókból építkező *bottom-up* (alulról-felfelé) módszerek csoportjába soroljuk.¹³ A *top-down* szintézisek alatt rendszerint olyan folyamatokat értünk, amelyek valamilyen fizikai erőt (mechanikai, hő, elektromos kisülés, elektromágneses sugárzás, plazma) felhasználva csökkentik a szemcseméretet a tömbfázistól a nano mérettartományig.^{100,124–126} Ezeknek a módszereknek általános előnye, hogy többnyire

gyorsan és alacsony anyagigénnyel készíthetünk nanorészecskéket, hátrányuk azonban a nagy energiaigény, magas polidiszperzitás és alacsony hozam. A *bottom-up* eljárások ezzel szemben olyan változatos, többnyire kémiai és biológiai szintézismódszerek, amelyek molekuláris, atomi vagy ionos elemekből építkezve alakítanak ki nagy monodiszperzitású és egységes morfológiájú részecskéket, jöllehet magasabb anyagigénnyel.¹²⁷

Habár a szakirodalomban találhatunk leírásokat gázfázisú depozíción alapuló, vagy akár szilárd fázisú, őrléssel fabrikált *bottom-up* nanorészecskékről,^{126,128} a publikációk túlnyomó része folyadékfázisú recepteket mutatnak be. A nanoezüst folyadékfázisú szintézismódszereinek hatékonyságát négy fő komponens anyagi minősége és aránya határozza meg. Fontos az ezüst forrás megválasztása, amely rendszerint valamilyen só, továbbá szükség van megfelelő redukáló és stabilizáló szerekre, illetve a megfelelő oldószer megválasztására.¹²⁹ A szintézis sikerességének (megfelelő diszperzitás) alapja a megfelelő nukleációs kinetika. A nukleációt (magképződést) az oldatban lévő Ag^0 atomok időfüggő koncentrációja határozza meg, amely két ellentétes folyamat változásának eredménye: az ezüst ionok redukciója növeli az Ag^0 koncentrációt, a nanorészecske képződés pedig csökkenti azt.¹³⁰ A tapasztalatok szerint a prekursor enyhe feleslege a részecskék méretének növekedését eredményezi, míg nagy feleslege az új részecskék nukleációjához vezet.¹³¹ Az ezüst prekursor, és redukálószer által meghatározott Ag^0 kinetikán túl a stabilizálószer is hatással lehetnek a reakciók sikerességére, hiszen ezek felületi adszorpciója befolyásolhatja a kristálynövekedés orientációját, ami a részecskék alakjának megváltozását eredményezheti. Ezt a jelenséget számos stabilizálószerrel megfigyelhetjük, mint például az elektrosztatikus stabilizáció előidézésére legáltalánosabban használt citrát csoportok, illetve a nagy biokompatibilitást és erős szterikus stabilizációt biztosító polivinil-pirrolidon esetén is.^{106,132}

A *bottom-up* kémiai szintézisek túlnyomó többsége négy megközelítés valamelyikébe sorolható: ezek a Turkevich (citrát) módszerek, nátrium-bór-hidrides redukációs módszerek, Tollens (ezüsttükör) reakciók és poliol módszerek. A Turkevich módszerek olyan AgNO_3 redukációs reakciók, ahol trinátrium-citrátot használunk stabilizáló és redukálószerként egyaránt.^{133,134} Annak ellenére, hogy ezek a legrégebben kifejlesztett módszerek ezüst nanorészecske gyártásra, a mai napig előszeretettel használjuk őket egyszerűségük miatt. A bór-hidrides redukciók alapja, hogy a NaBH_4 redukálóképessége sokszorosa a citráténak, így jobban kontrollálható a kialakuló részecskék mérete és morfológiája.^{135–137} Ennek köszönhetően napjainkban ezek a módszerek a legelterjedtebb kémiai nanoezüst szintézismódszerek. Az ezüsttükör reakciók során AgNO_3 helyett

Tollens reagenst ($\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{OH}$) használunk ezüst forrásként valamilyen formil-csoportot tartalmazó redukálószer ellenében (pl. redukáló cukrok). Ugyan ezek a módszerek nem annyira népszerűek, mint az ezüst-nitrátot alkalmazó reakciók, nagyon érdekes szintézis utakat nyitnak meg, különböző morfológiájú, például core-shell részecskék szintézise esetén.⁹⁹ Utolsó csoportként meg kell említenünk a poliol módszereket, amelyek során több hidroxil-csoportot tartalmazó szerves vegyületek (polimerek, cukoralkoholok) redukáló és stabilizálószerként való felhasználásával alakítunk ki precíz morfológiával rendelkező részecskéket.^{138,139}

A kémiai módszerek alapelveit alkalmazó biológiai szintézis eljárások egy hatalmas területet magába foglaló csoport, amelynek alapvető kritériuma, hogy a reakciókban használt redukáló-, és stabilizálószer biológiai eredetűek legyenek.¹³ Kémiai szempontból ezek a biológiai reaktánsok többnyire aminosavak, cukrok, fenolszármazékok, flavonoidok, vagy terpének.^{96,140–142} A szintézisek során ezeket felhasználhatjuk passzív módon, különböző növényi és mikrobiális extraktumok kinyerése és laboratóriumi felhasználása révén,^{131,143–146} de akár élő növényi és mikrobiális rendszerek aktív folyamatait kihasználva is szintetizálhatunk nanoméretű ezüstöt.^{120,128,141}

A nanorészecskéket tanulmányozó kutatások elengedhetetlen lépése a részecskék alapvető tulajdonságainak megismerése annak érdekében, hogy a felhasználásuk során tapasztalt eredményeket értelmezhesük. Habár a nanorészecskék jellemzésére szolgáló módszerek tárháza rengeteg lehetőséget kínál, a szakirodalom alapján az ezüst nanorészecskék esetében ezek közül kimagasló jelentőséggel bírnak a transzmissziós elektronmikroszkópos, és az ultraibolya-látható fény spektroszkópiás vizsgálatok. A következő fejezetekben ezen módszerek bemutatása, és ezüst nanorészecskékre vonatkozó relevanciája kerül tárgyalásra.

2.3.2. Ezüst nanorészecskék jellemzése

2.3.2.1. Méret és Morfológia – A Transzmissziós elektron mikroszkópia és jelentősége

Az ezüst nanorészecskék előnyös tulajdonságait a részecskék mérete, alakja és kristályszerkezete nagymértékben befolyásolja. Ezeknek a tulajdonságoknak a vizsgálata során a nanotechnológiában használt számos eszköz közül a transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) az egyik legelterjedtebb, hiszen mindhárom paraméter egyidőben és nagy pontossággal jellemezhető. A transzmissziós elektronmikroszkópok olyan, a hagyományos fénymikroszkópia elveivel analóg eszközök, amelyek fény helyett elektronsugarat használnak anyagvizsgálatra.¹⁴⁷

Rendkívül sokoldalú, nagy nagyítást és felbontást biztosító műszerek, melyekkel akár atomi léptékű felvételeket készíthetünk. A méreten és morfológián túl pontos információkat kaphatunk például a részecskék felszínén megjelentő kristályszerkezetekről, ami azért jelentős, mert az ezüst nanorészecskék élein szorosabb rácsba rendeződött (magasabb Miller indexű) régiókból könnyebb az ezüst ion kioldódása, mint a lapokon.^{148,149} Az eddig említett morfológiai vizsgálatok mellett a TEM élettudományi jelentőséggel is bír, amelyet a nanotechnológiában is felhasználhatunk, például nanorészecske koronák vizsgálatára, vagy bizonyos sejtes kölcsönhatások vizuális reprezentációjára.^{150–152}

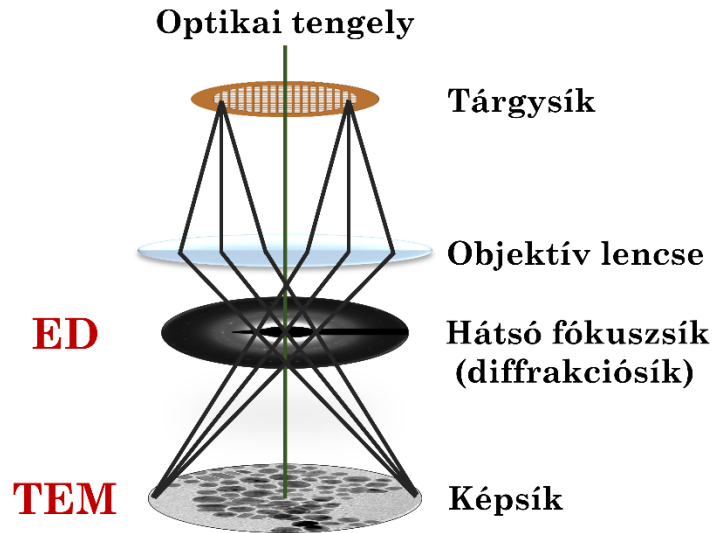
A nanotechnológiához kötődő képalkotó technikák értelemszerűen törekednek a minél nagyobb nagyítás elérésére. Mikroszkópos felvételek esetén azt a legkisebb fizikális távolságot, amit még külön képpontokként tudunk értelmezni, feloldóképességnek nevezzük, és az Abbe-törvény írja le¹⁵³:

$$d = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \alpha} = 0,61 \frac{\lambda}{NA}$$

Ahol d a feloldóképesség, λ a képalkotáshoz használt sugárzás hullámhossza, $n \sin \alpha$ pedig a numerikus apertúra (NA). Mivel a feloldóképesség és a sugárzás hullámhossza egyenesen arányosak egymással, minél kisebb a felhasznált sugár hullámhossza, annál kisebb távolságokat tudunk elkülöníteni a mikroszkópos képeken. Anyaghullámok –így az elektronok– esetén a hullám energiájának és hullámhosszának viszonyát a de Broglie által kiterjesztett Planck-Einstein egyenlet jellemzi¹⁵⁴:

$$p = h\nu' = \frac{h}{\lambda}$$

Ahol p az anyaghullám részecskéjének impulzusa, h a Planck állandó, és $\nu' = 1/\lambda$ a hullámszám. Az összefüggésekből következik, hogy elektronmikroszkópos képalkotás során a feloldóképesség a felhasznált elektronok energiájától (lendületétől) függ, ezért megfelelő gyorsítófeszültséggel nagyságrendekkel meghaladhatjuk az optikai mikroszkópok határait.



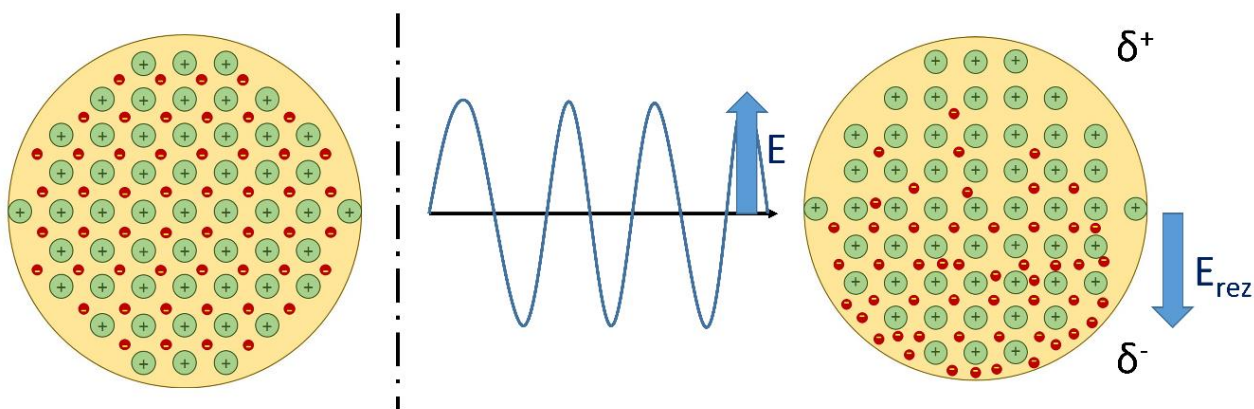
8. ábra Transzmissziós és elektrondiffrakciós leképezések szemléltetése

Habár az elektronmikroszkópos technikák esetében számos elektron-anyag kölcsönhatás megfigyelése lehetséges, a gyakorlatban legelterjedtebb eljárások a transzmittált (áteresztett) és diffraktált (elhajlott) elektronok segítségével szolgáltatnak információkat (8. ábra). Klasszikus képalkotás során a transzmittált (és kis szögben diffraktált) elektronok segítségével vetületi képeket készíthetünk a mikroszkóp képsíkjáról, amelyek alapján a vizsgált objektumok mérete, alakja, illetve kristályos anyagok nagy felbontású leképezése esetén, a kristálysíkjai is megjeleníthetővé válnak.

Elektrondiffrakciós (ED) módban a mikroszkóp hátsó fókusz síkja (diffrakciósíkja) kerül leképezésre, ahol a vizsgált anyagok kristályszerkezetéről nyerhetünk információkat. A kristályos anyagok rácssíkjainak meghatározott geometriája meghatározott szögben téríti el a beérkező elektronokat, amelyek az elektrondiffrakciós felvétel középpontjától meghatározott távolságra lévő koncentrikus köröket (polikristályos anyag), illetve pontcsoportokat (egykristályos anyag) alkotnak. Egy elektrondiffrakciós felvételtől a mintákra jellemző rácstávolságok kiszámíthatók a megjelenő pontok középponttól mért távolságainak reciprokából. A kristályszerkezet meghatározása egyfelől az anyagi minőségről adhat tanúbizonyságot, másrésről pedig a különböző Miller-indexszel jelölt rácok meghatározása is lehetségessé válik.

2.3.2.2. Felületi plazmon rezonancia – Az ultraibolya-látható spektroszkópia jelentősége

Bizonyos nemesfém nanorészecskék (pl. Cu, Ag, Au) különleges optikai tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyeket az anyagok színének általános indoklásául szolgáló kromofór csoportokkal nem lehet megmagyarázni. A tapasztalatok magyarázata a részecskéket alkotó fémek elektronszerkezetében keresendő, és a mögöttes jelenséget felületi plazmon rezonanciának (SPR, *surface plasmon resonance*) nevezzük.¹⁵⁵ A SPR jelenség egy meglehetősen bonyolult részecskefizikai folyamat, az alapjai azonban klasszikus fizikai megközelítésekkel is jól szemléltethetők.



9. ábra Fémrács (balra) és a felületi plazmon rezonancia kialakulása (jobbra)

A felületi plazmon rezonancia klasszikus fizikai magyarázatát az 9. ábra mutatja be. Mint ismeretes, a fémrács rácspontjaiban fém atomtörzsek helyezkednek el, míg a vegyérték elektronok delokalizálódnak, ezzel biztosítva a fémek elektromos vezetőképességét. Ezek az elektronok egyfajta plazmaszerű állapotban vannak, és megfelelő hullámhosszúságú elektromágneses sugárzással (pontosabban annak elektromos terével, E) a felületen lévő elektronok oszcilláló mozgásra bírhatók. A kialakuló elektron oszcilláció saját elektromos erőteret generál a gerjesztő sugáréval ellentétes fázisban (E_{rez}). Ezeket az elektron oszcillátorokat nevezzük felületi plazmonoknak; a plazmon az elektron oszcilláció egysége, hasonlóan ahhoz, ahogy az elektromágneses sugárzása a foton. Nanorészecskék esetén a méretcsökkenésből adódóan a felületi plazmonok és az általuk előidézett elektromos erőter mérete (és ezáltal energiája) is lecsökken, ami miatt már látható fénnel is gerjeszthetővé válnak, változatos színeket kölcsönözve a nanorészecskéknek.¹⁵⁶

A nemesfém nanorészecskék felületi plazmon rezonanciájának vizsgálatára szolgáló legegyszerűbb módszer az ultraibolya-látható (UV-Vis) spektroszkópia, ugyanis a részecskék jól diszpergált, stabil szoljainak fényelnyelése karakterisztikus abszorpciós spektrumot eredményez. Az elnyelési spektrumok csúcsainak pozíciója és szélessége függ a részecskék anyagi minőségétől, méretétől, diszperzitásától és alakjától is. Az SPR nagymértékben hangolható ezeknek a tulajdonságoknak a módosításával, ezüst nanorészecskék segítségével például a látható spektrum valamennyi színe létrehozható különböző méretű és alakú részecskék keverékének kolloid oldataiból.¹⁵⁷

Az ezüst nanorészecskék kutatása során az SPR spektrumok vizsgálata elsődlegesen bizonyítja egy szintézis sikerességét, az elnyelési csúcsok megjelenése és intenzitásuk emelkedése arányos a keletkező részecskék mennyiségével.¹⁵⁸ Az anyagi minőségen túl a spektrumok utalnak a részecskék alakjára is; a gömb alakú nanorészecskék elnyelése rendszerint egy 400 nm-es csúcsban összpontosul, a háromszög alakúak elnyelése egy szélesebb régióban, valahol 500 és 1000 nm között helyezkedik el,^{136,159} míg a pálcika alakú részecskék (és bizonyos esetekben a kis aggregátumok) mindkét régióban egyszerre mutatnak elnyelést.^{134,160} Az SPR megváltozhat a részecskék környezetének hatására is, a felületre adszorbeálódó anyagok, illetve a szintézisek során használt stabilizálószerke is hatással vannak a részecskék elnyelésére.¹⁵⁶

A nanoezüst felületi plazmon rezonanciája azonban nem pusztán egy beazonosításra alkalmas tulajdonság, hanem egy aktív, analitikai jelentőséggel bíró jelenség. Az ezüst nanorészecskék SPR aktivitása miatt jelentőségük van a felületerősített Raman spektroszkópiában (SERS – *surface enhanced Raman spectroscopy*) mint jelerősítő anyagok, vagy használhatjuk őket iondeszorpciós komponensekként nanoanyag-asszisztált lézer deszorpciós/ionizációs (NALDI - *Nanostructure-Assisted Laser Desorption/Ionization*) vizsgálatok során.^{97,161} Végezetül érdemes megemlíteni, hogy a felületi plazmon rezonancia elősegíti az úgy nevezett „forró elektronok” megjelenését. Ezek olyan, nagy kinetikus energiával rendelkező elektronok, amelyeknek jelentősége lehet a napenergia hasznosításában, illetve kölcsönhatásba léphetnek a felületre adszorbeálódott molekulákkal is, így biológiai szempontból jelentős, fotokatalitikus aktivitást indukálhatnak.^{162,163}

3. CÉLKITŰZÉS

Különleges biológiai aktivitásuknak köszönhetően, az ezüst nanorészecskék a nanoméretű szerkezetek előállításának és kutatásának egyik központi szereplője. A mindennapi életben fellelhetők például mint kozmetikumok, háztartási eszközök, textilek, élelmiszer-csomagolók, antimikrobiális szerek alkotóelemei. Habár a nanoezüst elsődleges hatásmechanizmusával sok kutatás foglalkozik, a részecskék aggregációjának kérdése rendszerint háttérbe szorul, holott jelentős befolyása lehet a biológiai aktivitásra, továbbá pont azok az alapvető paraméterek befolyásolják a legjobban (mint a részecskeméret és a felületi stabilizálószer), amelyek a bio-nano kutatások során a legnagyobb figyelmet kapják. Mindezeken felül a biológiai rendszerek messze nem ideálisak az ezüst nanorészecskék kolloidstabilitásának szempontjából, hiszen a változatos pH, elektrolit és makromolekuláris összetétel és koncentrációviszonyok mellett a részecskéken változatos felületi kölcsönhatások játszódhatnak le.

Kutatómunkám kezdetén célul tűztük ki, hogy az ezüst nanorészecske szintézis különböző paramétereinek kolloidstabilitásra gyakorolt hatását biológiailag releváns körülmények között tanulmányozzuk, továbbá hogy megvizsgáljuk a részecskeaggregátumok közvetlen *in vitro* biológiai hatását is. Ez a multidiszciplináris kutatás a kémia, anyagtudomány és sejtbiológia eszközeivel élve próbál egyfajta hidat képezni a különböző területek között, egy átfogó képet adva a nanorészecske-aggregáció biológiai jelentőségéről.

A doktori munkám céljai a következők voltak:

- Három különböző méretű, citrát csoportokkal elektrosztatikusan stabilizált, továbbá a legkisebbel azonos méretű, sztérikusan (polivinil-pirrolidonnal) és elektrosztérikusan (zöld teával) stabilizált ezüst nanorészecske minták szintézise és karakterizálása.
- A részecskék aggregációs viselkedésének tanulmányozása biológiailag jelentős pH viszonyok, különféle nátrium-klorid, glükóz és glutamin koncentrációk mellett, illetve sejtmedium alkotók jelenlétében.
- Az aggregációs vizsgálatok eredményeit felhasználva az aggregátum képződés közvetlen toxicitásra gyakorolt hatásának modellezése *in vitro* citotoxicitási és antimikrobiális tesztek segítségével.

4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Ezüst nanorészecskék szintézise

A következő fejezetekben öt különböző ezüst nanorészecske minta szintézise és jellemzése kerül tárgyalásra. Habár a minták elnevezése előre vetíti a részecskék bizonyos tulajdonságait, az átláthatóság érdekében célszerű a jelöléseiket előre bevezetni.

Minta	Rövidítés
Citrát csoportokkal stabilizált, átlagosan 10 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék	AgNP@C ₁₀
Citrát csoportokkal stabilizált, átlagosan 20 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék	AgNP@C ₂₀
Citrát csoportokkal stabilizált, átlagosan 50 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék	AgNP@C ₅₀
Polivinil-pirrolidonnal stabilizált, átlagosan 10 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék	AgNP@PVP ₁₀
Zöld tea kivonattal stabilizált, átlagosan 10 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék	AgNP@GT ₁₀

1. táblázat A szintetizált ezüst nanorészecske minták rövidítései

Az elkészített minták segítségével lehetőségünk adódott az ezüst nanorészecskék viselkedésének tanulmányozására életszerű körülmények között oly módon, hogy a részecskeméret, és a stabilizáló mechanizmus (elektrosztatikus, szterikus elektrosztérikus) erre gyakorolt hatását is tanulmányozhassuk.

A részecskék szintéziséhez használt vegyszereket, mint ezüst-nitrát (AgNO₃), nátrium-bórhidrid (NaBH₄), trinátrium-citrát dihidrát (Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O), illetve polivinil-pirrolidon (PVP, átlagos molekulatömeg: 40 kDa), a Sigma-Aldrich Kft-n keresztül szereztük be, a felhasznált zöld tea pedig Twinings (R. Twining & Company Ltd.) márkájú volt.

4.1.1. Citrát csoportokkal stabilizált nanorészecskék előállítása és növesztése

A citrát csoportokkal stabilizált, különböző méretű ezüst nanorészecskéket több, egymást követő lépésben állítottuk elő. A legkisebb részecskéket ezüst-nitrát kémiai redukciójával, a nagyobb részecskéket pedig magnövesztési módszerrel szintetizáltuk.

A legkisebb részecskék (AgNP@C_{10}) szintéziséhez először 75 mL 9 mM-os trinátrium-citrát vizes oldatát készítettünk el, majd ezt 70 °C-ra melegítettük. Ehhez 2 mL 1 w/v%-os AgNO_3 oldatot adtunk, majd 2 mL 0,1 w/v%-os frissen elkészített NaBH_4 oldatot csepegtettünk. A kialakult aranybarna szuszpenziót egy órán át kevertettük 70 °C-on, majd hagytuk magától szobahőmérsékletre lehűlni. Ez a minta szolgált a következő lépés alapjául.

A magnövesztés lépés során 90 mL 7,6 mM-os citrát oldathoz 10 mL AgNP@C_{10} részecskéket tartalmazó szolt adtunk 80 °C-on, majd ehhez a reakcióelegyhez 2 mL 1 w/v%-os ezüst-nitrát oldatot adtunk és egy órán át kevertettük ezen a hőmérsékleten, amely a középső mérettartományú nanoezüst képződéséhez vezetett (AgNP@C_{20}).

Végül a legnagyobb részecskék (AgNP@C_{50}) szintéziséhez az előző növesztés lépést ismételtük annyi eltéréssel, hogy a 10 mL ezüst szuszpenzió nem a legkisebb, hanem a második lépésben növesztett részecskéket tartalmazta.

A minták elkészültével, 1 napon keresztül cellulóz membrán segítségével dializáltuk a kolloidokat megfelelő koncentrációjú citrát oldat ellenében, majd a szolok ezüstre nézett névleges koncentrációját 150 ppm-re állítottuk (szükség szerint bepárlással, vagy hígítással), majd felhasználásig 4 °C-on tároltuk őket.

4.1.2. Polivinil-pirrolidonnal stabilizált nanorészecskék előállítása

A polivinil-pirrolidonnal stabilizált részecskék (AgNP@PVP_{10}) szintézisét az előző fejezetben ismertetett kémiai redukciós reakció módosításával készítettük. A polimer 0,17 g-ját 95 mL ioncserélt vízben feloldottuk, majd 70 °C-on ehhez adtuk a 2 mL 1 w/v%-os AgNO_3 oldatot, illetve a 2 mL 0,1 w/v%-os, friss NaBH_4 oldatot, majd 1 órán át kevertettük a reakcióelegyet ezen a hőmérsékleten. Az eredményül kapott aranybarna szuszpenziót dializáltuk, 150 ppm koncentrációra igazítottuk, majd 4 °C-on tároltuk a kísérletek kezdetéig.

4.1.3. Zöld teával stabilizált ezüst nanorészecskék előállítása

Ebben a zöld szintézisben a zöld tea egyszerre viselkedett stabilizáló-, és redukálószerként is. Szárított és aprított zöld tea levelek 2 g-jából 100 mL ioncserélt vízzel extraktumot készítettünk 20 perces kevertetés mellett 80 °C-on, majd a teát egy 0,45 μm pórusméretű nylon membrán segítségével átszűrtük.

A nanorészecskéket (AgNP@GT₁₀) az így készített extraktum és 0,1 M-os AgNO₃ oldat 2:1 térfogatarányú összekeverésével készítettük szobahőmérsékleten. A 24 órás kevertetés elteltével a terméket 0,22 µm-es fecskendőszűrő segítségével újra átszűrtük, ezüst koncentrációját 150 ppm-re állítottuk, majd felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

4.2. Részecskék karakterizálása

A szintézisek sikerességét transzmissziós elektronmikroszkópiával vizsgáltuk egy FEI Tecnai G² 20 X-Twin mikroszkóp segítségével, 200 kV-os gyorsítófeszültség mellett. A mintákat 200 mesh rácsméretű amorf szén hártás réz rostélyokra (gridekre) cseppentettük, majd ezekről felvételeket készítettünk. A részecskék méretét, diszperzitását és morfológiáját mintánként 15 reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel kiértékelésével jellemeztük, a kristályszerkezetüket (és ezáltal összetételüket) elektrondiffrakciós felvételekkel vizsgáltuk. A részecskék anyagi minőségére további bizonyítékokat szereztünk a felületi plazmon rezonanciájukból származó karakterisztikus elnyelési UV-Vis spektrumaik segítségével, amelyeket egy Ocean Optics 355 DH-2000-BAL UV-Vis spektrofotométer segítségével mértünk meg.

A primer nanorészecskék tulajdonságain túl, a kapott kolloid rendszerek kiindulási stabilitását is jellemeztük dinamikus fényszórásmérés és zéta-potenciál meghatározás segítségével, egy Malvern Zetasizer Nano ZS műszer használatával.

4.3. Aggregációs vizsgálatok

Az ezüst nanorészecske minták kolloidstabilitásának jellemzését három tényező változásának megfigyelésével végeztük el: a minták átlagos hidrodinamikai átmérőjének, illetve zéta-potenciáljának változását, továbbá a részecskék karakterisztikus fényelnyelési csúcsainak változása információkat szolgáltatott az aggregáció mértékére, felületi reakciókra és bizonyos esetekben a nanorészecskék kémiai stabilitásának változására is. A méréseket 5 mL térfogatú mintákban végeztük, amelyekben kialakítottuk az adott mérési körülményeket, a nanorészecskéket pedig 10 ppm körüli koncentrációra állítottuk, ahol az UV-Vis abszorbancia 1 közeli értéket vett fel. Ilyen körülmények között azok a faktorok, melyek hatásait vizsgálni kívántuk, nagyságrendekkel nagyobb koncentrációkban voltak jelen, mint a részecskék, ahogy ez egy valós szituációban is történne.

A kísérletek során használt biológiai szempontból jelentős körülmények az alábbi táblázatban láthatók:

Körülmény	Mennyiség
pH	3; 5; 7,2 [†] ; 9
NaCl koncentráció (mM)	10; 50; 150
Glükóz koncentráció (mM)	3,9; 6,7
L-glutamin koncentráció (mM)	4
DMEM (v/v%)	45
FBS (v/v%, vízben illetve DMEM-ben egyaránt)	5

2. táblázat A kutatás során vizsgált bioreleváns körülmények összegzése, a referencia mérés (†) egy 7,2 pH-jú és 10 mM NaCl koncentrációjú háttélelektrolit közegben végzett méréssorozatot jelöl

A változatos pH értékek vizsgálatával igyekeztünk modellezni a különböző emlős szervrendszerek szélsőséges pH viszonyait,¹⁶⁴ míg a nátrium-klorid koncentrációk esetében a fiziológiás elektrolit koncentrációkat szem előtt tartva határoztuk meg a beállítandó értékeket.^{165,166} Az élő szervezetekben fellelhető kismolekulák hatásának modellezéséhez a glükózt és a glutamint választottuk. A kiválasztott glükóz mennyiségek egy egészséges felnőtt ember vércukor koncentrációjának határaihoz igazodnak.¹⁶⁷ A glutamin a sejtszétválás alatti nukleotid szintézishez esszenciális faktor,¹⁶⁸ valamint a legnagyobb mennyiségben szabadon előforduló aminosav az élő szervezetekben. A kiválasztott 4 mM-os koncentráció az *in vitro* vizsgálatok során rutinszerűen alkalmazott koncentrációja ennek az aminosavnak.¹⁶⁹

Az imént felsorolt egyszerűbb tényezők hatásainak tanulmányozását követően szeretnénk volna a részecskék viselkedését olyan körülmények között is megvizsgálni, amelyek jobban tükrözik a biológiai és környezeti rendszerek összetettségét. Ezt a későbbi citotoxicitás vizsgálatok során használt sejtmédium-alkotók, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) és magzati borjúsérum (*fetal bovine serum* – FBS) segítségével modelleztük. A médium alkotók mennyiségének meghatározásában az *in vitro* kísérletek során ideális viszonyok voltak a mérvadók. A toxicitási vizsgálatok alatt szükséges feltételnek bizonyult az, hogy a kísérleti közegek teljes térfogatának minimum fele sejtmédium legyen (amelynek összetétele 90% DMEM és 10% FBS), ezalatt ugyanis a kedvezőtlen ozmotikus viszonyok miatt a sejtek elpusztulnak. A gyakorlatban ezért olyan kísérleti közegekben dolgoztunk, amelyek 1:1 térfogat arányban tartalmaztak nanorészecske szuszpenziókat és sejtmédiumot, a 2. táblázatban látható értékek pedig ezt az arányt tükrözik.

Mindegyik méréssorozat 24 órán át tartott, amely során a 0; 1,5; 3; 6; 12 és 24 órás időpontokban lemértük a minták átlagos hidrodinamikai átmérőjét és zéta-potenciálját Zetasizer műszer segítségével, illetve a karakterisztikus fényelnyelési spektrumát UV-Vis spektrofotométer segítségével. A 0 órás időpontot a minták összemérését követő 30 másodperces, 37 kHz-es szonikálás után indítottuk, a mintákat az egész méréssorozat alatt 37 °C-on tartottuk. A mérések előtt a minták pH-ját leellenőriztük és szükség esetén korrigáltuk. Mindegyik bioreleváns körülmény hatását 7,2-es pH-n és 10 mM háttér NaCl koncentráció mellett vizsgáltuk, ami alól természetesen kivételt képeznek azok a kísérletek, ahol ezek az értékek voltak a változók, illetve a médium alkotókat tartalmazó kísérletek, ahol a komplex közegek jellemzése volt a cél. A 7,2-es pH-t a biológiai jelentősége miatt választottuk, a háttélelektrolit jelenléte pedig a részecskék közötti nagytávolságú részecske-kölcsönhatásokból származó mérési bizonytalanságokat csökkentette.⁸⁷ Ezen megfontolások alapján a pH 7,2-es mérések eredményeit minden AgNP minta esetén referenciaként használtuk a többi bioreleváns körülmény értelmezése során.

Minden felhasznált vegyszer a Sigma-Aldrich Kft-n keresztül került beszerzésre.

4.4. *In vitro* toxicitási kísérletek

4.4.1. Citotoxicitás tesztek

A kísérletekhez használt humán tüdő adenocarcinoma (A549), méhnyak- (HeLa) és prosztata rák (DU145) tumoros sejtvonalakat, illetve humán tüdő fibroblaszt (MRC-5) és keratinocita (HaCaT) nem tumoros sejtvonalakat az ATCC-től vásároltuk meg. Minden sejtvonal 10% FBS-t tartalmazó DMEM médiumban volt fenntartva, ami 2 mM L-glutamint, 0,01% sztreptomomicint és 0,005% ampicillint tartalmazott. A különböző cukortartalmú DMEM médiumok közül A549, HeLa és MRC-5 esetén 1 g/L, DU145 és HaCaT sejtvonalak esetén pedig 4,5 g/L glükózt tartalmazó változatokat használtunk. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ és 95%-os páratartalom mellett inkubáltuk. Minden vegyszert a Sigma-Aldrich vállalatától vásároltuk.

A nanorészecske aggregáció citotoxicitásra gyakorolt hatását kétlépéses MTT esszé segítségével jellemeztük. Elsőként minden ezüst mintára meghatároztuk az adott sejtvonalakra jellemző IC₅₀ koncentrációkat. Ehhez a sejtvonalakat 96 lyukú lemezekre osztottuk ki 10000 sejt/lyuk koncentrációban, amiket egy egynapos inkubációt követően különböző koncentrációjú AgNP szuszpenziókkal kezeltünk, amely szintén 24 órán át tartott. A kezelést követően a sejteket PBS pufferrel átmostuk és 0,5 mg/mL MTT reagenst tartalmazó sejtmédiumban inkubáltuk 37 °C-

on 1 órán keresztül. A képződő formazán kristályokat dimetil-szulfoxidban oldottuk fel, majd ezek fényelnyelését 570 nm-en egy Synergy HTX plate reader segítségével mértük meg. A sejtek viabilitását úgy határoztuk meg, hogy a kezeletlen kontroll csoportok viabilitását vettük 100%-nak. A második lépésben különböző mértékben aggregálódott nanorészecske diszperziókat hoztunk létre az IC₅₀ értékek kétszeresének megfelelő koncentrációkban, mivel a sejtek kezelése során alkalmazott reakcióközegben - melynek egyik felét a médium, a másik felét a részecske szuszpenzió szolgáltatja – így a megfelelő koncentrációk mellett vizsgálhattuk az aggregáció hatását. Ehhez az előzetesen elvégzett aggregációs vizsgálatok eredményeit használtuk fel, miszerint a 150 mM-os NaCl koncentráció egy olyan körülmény, amely a sejtek növekedését nem befolyásolja, azonban erélyes aggregációt képes előidézni az arra érzékeny ezüst minták esetén. A kolloidstabilitási kísérleteket követve a nanoezüst szuszpenziókat 0; 1,5; 3; 6; 12 és 24 órán át aggregáltattuk 150 mM nátrium kloriddal, majd ezekkel kezeltük az egyes sejtvonalakat az előző bekezdésben leírt MTT mérések menete szerint 1:1 térfogat arányban (50-50 µl/lyuk).

Fontosnak tartottuk mind tumoros, mint egészséges sejtvonalakon megvizsgálni az ezüst nanorészecskék hatását. A kísérletek hosszúsága miatt azonban nem adódott lehetőségünk arra, hogy minden AgNP mintát ugyanazon a sejtvonalon vizsgáljunk. Azt, hogy az egyes mintákat melyik sejtvonalakon vizsgáltuk meg, a 3. táblázat szemlélteti. A táblázat alapján látható, hogy az AgNP@C₁₀ mintát a legtöbb sejtvonalon leteszteltük, ettől remélve a teljes kísérletsorozat összehasonlíthatóságát az egyes nanorészecske minták között. A végeredmények statisztikai szignifikanciájának meghatározására párosítatlan t-próbákat végeztünk GraphPad Prism 7 szoftver segítségével ahol a szignifikancia szinteket * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), és **** ($p \leq 0,0001$) szerint határoztuk meg.

Ezüst nanorészecske minta	Nem tumoros sejtvonal	Tumoros sejtvonal
AgNP@C ₁₀	MRC-5 HaCaT	A549 DU145
AgNP@C ₂₀	HaCaT	DU145
AgNP@C ₅₀	HaCaT	DU145
AgNP@PVP ₁₀	HaCaT	HeLa
AgNP@GT ₁₀	MRC-5	A549

3. táblázat A citotoxicitási vizsgálatokhoz használt sejtvonalak az egyes nanorészecske minták esetén

4.4.2. Antimikrobiális vizsgálatok

A kísérletekhez használt mikrobákat úgy választottuk ki, hogy gomba, illetve Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium törzs is legyen köztük. *Cryptococcus neoformans* gombát az IFM 5844 (IFM; Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses), *Bacillus megaterium* Gram-pozitív baktérium törzset az SZMC 6031 (SZMC: Szeged Microbiology Collection), *Escherichia coli* Gram-negatív baktérium törzset pedig az SZMC 0582 készleteiből növesztettük, a kísérleteket pedig RPMI 1640-es médiumban végeztük.

Ismét kétlépéses toxicitási tesztekét végeztünk, a humán sejtes vizsgálatokhoz hasonlóan. Az első lépésben meghatároztuk a nanoezüst minták minimális gátló koncentrációját (MIC) minden egyes mikroba törzsre; a 96 lyukú lemezek edényeibe 50-50 µl sejtuszpenziót (10^5 sejt/lyuk RPMI 1640 médiumban) és változó koncentrációjú (0 és 75 ppm között felező léptékkel) AgNP szolokat mértünk. A kezelt sejteket 48 órán át inkubáltuk 30 °C-on, majd a kultúrák fényelnyelését 620 nm-en megmértük SPECTROstar Nano plate reader segítségével. A kísérleteket három alkalommal ismételtük, minden esetben 3 párhuzamos mérés mellett.

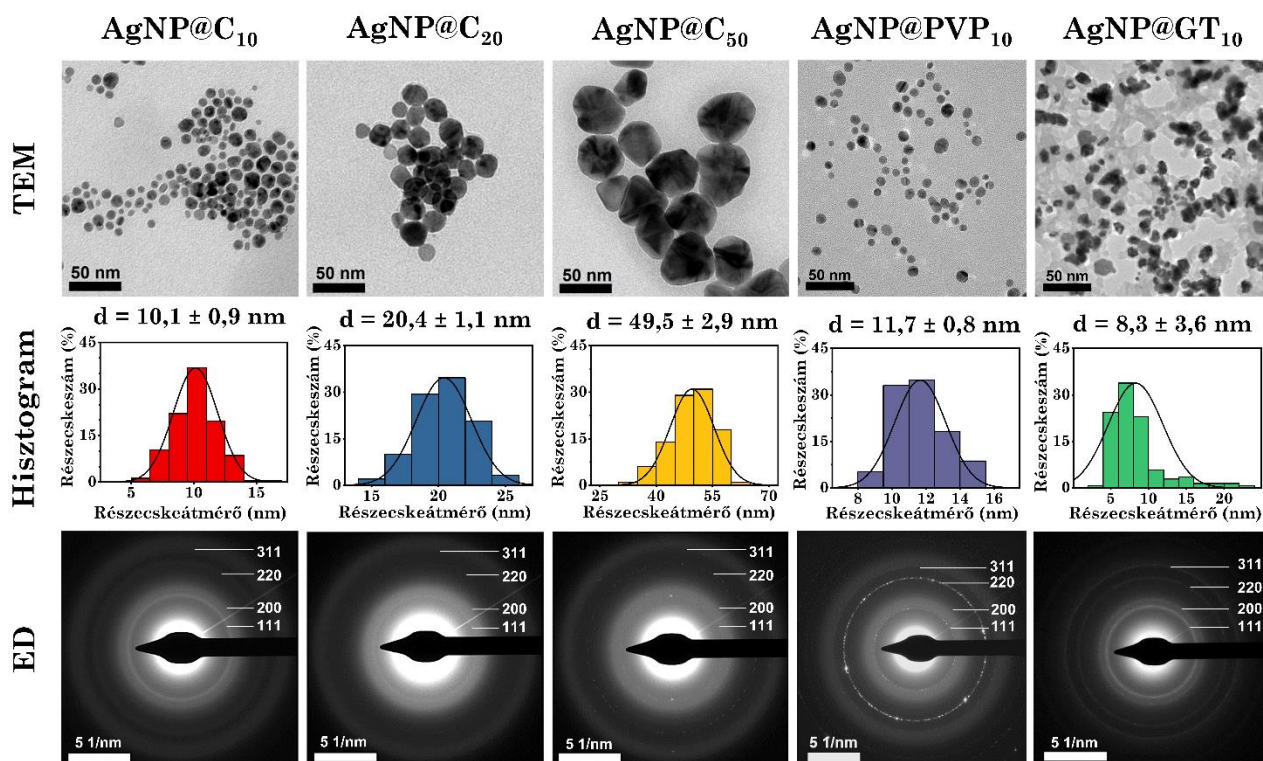
Ezután az aggregáció hatását a 4.4.1.-es fejezethez hasonlóan végeztük. Elkészítettük a 150 mM NaCl segítségével aggregáltatott ezüst szuszpenzió mintákat az adott MIC koncentrációk kétszeresének megfelelő koncentrációban, majd a médiumban lévő mikroba törzseket ezekkel kezeltük 96 lyukú lemezek 1:1 térfogat arányban. A 48 órás kezelést követően a részecskék aggregáció-függő toxicitását ismét a mikroba telepek 620 nm-en mért fényelnyelésének segítségével határoztuk meg, kontrollként nanoezüsttel nem kezelt mintákat használtunk. A végeredmények statisztikai szignifikanciájának meghatározására ismételt párosítatlan t-próbákat

végeztünk * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), és **** ($p \leq 0,0001$) szignifikancia szintek mellett.

5. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Kémiai karakterizálás

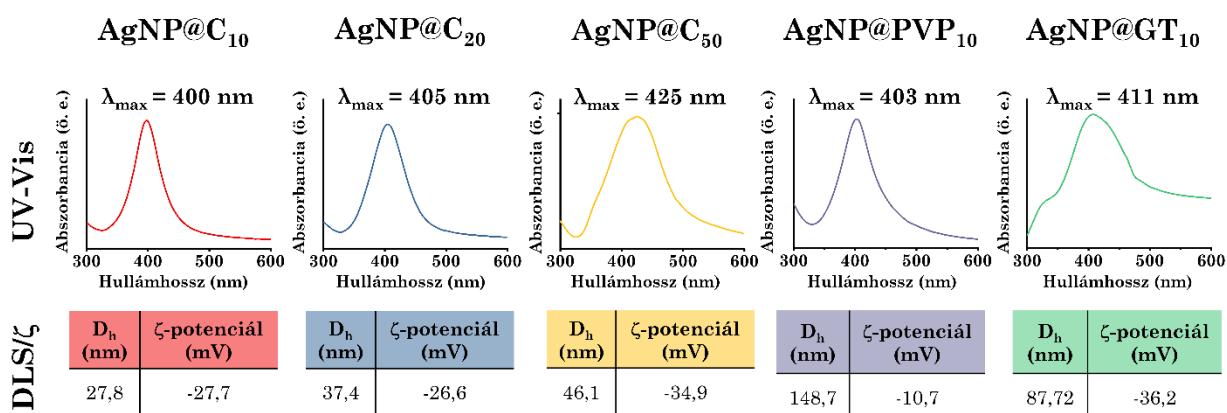
A szintézisek sikerességéről elsőként transzmissziós elektronmikroszkóppal bizonyosodtunk meg, amely eredményei a 10. ábrán láthatók. Az első három oszlop a citrát csoportokkal stabilizált, magnövesztéses módszerrel kialakított részecskék tulajdonságait szemléltetik (AgNP@C jelzésű minták), a negyedik és ötödik oszlopok pedig a polivinil-pirrolidonnal (AgNP@PVP₁₀), illetve a zöld teával (AgNP@GT₁₀) stabilizált ezüst nanorészecskéket mutatják be. A felvételek alapján megállapítható, hogy minden esetben sikeresen állítottunk elő gömbszerű nanorészecskéket. A gömb morfológiát valamelyest módosítani tudta a magnövesztéses lépések ismétlése, ahol a kristályok növekedésével egyre jobban kifejeződtek az ezüst kockarácsára jellemző élek,¹⁰⁵ illetve a zöld tea esetében az enyhébb redukálószer használata, amely befolyásolhatja a részecskék nukleációját.^{135,170} A zöld szintézis másik lényeges, a felvételen látható eredménye, hogy a részecskéket egy világosabb, alacsonyabb rendszámú atomokból felépülő hálózat veszi körül. Mivel ezek a képződmények az elektronsugár intenzitására érzékenynek mutatkoztak, kézenfekvővé vált, hogy a képen látható mátrix nem más, mint a zöld tea extraktum biomolekulái, amelyek képesek voltak körülvenni a részecskéket, ezzel egy „elsődleges biomolekuláris koronát” kialakítva.



10. ábra Különböző ezüst nanorészecske minták transzmissziós elektronmikroszkópos felvételei (felső sor), méreteloszlás histogramjai (középső sor) és elektrondiffrakciós mintázatai (alsó sor)

A célkitűzéseink a részecskék méreteinek tekintetében is megvalósultak. A magnövesztéses esetben három különböző, és jól elkülöníthető méreteloszlással rendelkező mintát szerettünk volna létrehozni, amelyekkel jól modellezhetjük a részecskeméret hatását a bioreleváns aggregációra. Az eredményként kapott, átlagosan 10, 20 és 50 nm-es részecskéket megfelelőnek találtuk erre a célra, hiszen a histogramjaik alapján ezeknek a kolloidoknak a méreteloszlása jól elkülönül egymástól. A stabilizálószeres esetében a célunk hasonló méretű és morfológiájú, de eltérő stabilitási mechanizmussal rendelkező minták összehasonlítása volt. A PVP-t használó szintézis nagyon hasonló morfológiájú, bár valamivel nagyobb (~12 nm) átlagos részecskeméretet eredményezett, mint amit az AgNP@C₁₀ részecskék esetében tapasztaltunk. A zöld teát alkalmazó szintézis során előállított AgNP@GT₁₀ minta esetén valamivel nagyobb morfológiai eltéréseket és méretbeli szórást tapasztaltunk, továbbá az átlagos részecskeméret is kicsivel alacsonyabbnak (~8 nm) bizonyult. A hasonlóságok és különbségek a szintézismódszerek paramétereiben keresendők; a citrátot és PVP-t alkalmazó receptek mindegyike nátrium-bórhidrides redukción alapult, ami erős redukálóképességével jól definiált gömböket eredményezett. Ezzel szemben a zöld tea extraktum lassabb reakciósebessége miatt a részecskék alakspecifitása valamelyest csökkent.¹⁷⁰

Az elektrondiffrakciós felvételek alapján a minták kristályszerkezetét, és közvetve kémiai összetételét tanulmányoztuk. Mind az öt AgNP minta esetén megfigyelhetők voltak az ezüstre jellemző, (111), (200), (220) és (311) Miller indexű rácsokhoz tartozó gyűrűk, mely alátámasztotta a nanorészecskék anyagi minőségét. A komparatív vizsgálatok szempontjából előnyös, hogy ugyanazok a Miller indexek jelentkeztek, hiszen a hasonló kristályszerkezetű anyagoktól hasonló biológiai aktivitásokat várhatunk, azonban a megjelenő gyűrűk intenzitásában és élességében különbségek mutatkoztak. Az eltérések a különböző stabilizálószerkezetek esetében az enyhe morfológiai különbségeknek tudhatók be, ami például a PVP-s minta esetén jól definiálttá tette a (220) Miller indexhez tartozó gyűrűt, ameddig a többi esetben ez meglehetősen halványan jelentkezett. Az AgNP@C magnövesztett minták tekintetében a gyűrűk egyre diffúzabbá váltak a részecskék méretének növekedésével, ez azonban inkább a mérések kivitelezésének eredménye, mintsem a részecskékből származó tulajdonság. Mivel az ED felvételek azonos nagyításon készültek, így azonos nagyságú térrészeket képeztünk le minden esetben. Ez a vizsgálandó objektumok méretének növekedésével arányosan szükségszerűen csökkenti a lemérhető részecskék számát, csökkentve a leütésszámot és így a gyűrűk élességét.



11. ábra Különböző ezüst nanorészecske minták karakterisztikus UV-Vis abszorpciós spektrumai, valamint átlagos hidrodinamikai átmérőit és zéta-potenciáljai a szintézist követően

Az elektronmikroszkópos méréseken felül megvizsgáltuk a részecske minták szintézis utáni karakterisztikus felületi plazmon rezonanciáját UV-Vis spektroszkópia segítségével, illetve a szolok alapvető kolloidstabilitását az átlagos hidrodinamikai átmérőiken és zéta-potenciáljaikon keresztül (11. ábra). A részecskék elnyelési spektrumai alátámasztották a TEM-es eredményeket, hiszen a szakirodalom alapján a gömb alakú ezüst nanorészecskék SPR aktivitása egy 400 nm körüli csúcsban jelentkezik, amely minden minta esetén jól detektálható volt, alátámasztva a

részecskék anyagi minőségéről és morfológiájáról alkotott elképzeléseinket.¹⁵⁷ A magnövesztéses AgNP@C minták karakterisztikus csúcsai a részecskék átlagos méretének növekedésével párhuzamosan vöröseltolódást mutattak, amely összhangban van a szakirodalomban leírtakkal.¹⁷¹ A különböző felületi borítással rendelkező AgNP@C₁₀, AgNP@PVP₁₀ és AgNP@GT₁₀ minták összehasonlításakor szintén különbségeket tapasztaltunk, a hasonló méreteloszlások ellenére. Ez a PVP-s minta esetében csak enyhe, nagyjából 3 nm-es, a zöld teás nanoezüst elnyelésében azonban erőteljesebb, 11 nm-es vöröseltolódást eredményezett a citrátos mintához képest. A jelenség magyarázata, hogy a felületre adszorbeálódó anyagok megváltoztathatják a dielektromos viszonyokat a részecskék körül, amely a plazmon rezonancia frekvenciájának megváltozását eredményezi.^{156,172}

A részecskék kezdeti kolloidstabilitásáról a minták átlagos hidrodinamikai átmérőinek (D_h) és zéta-potenciáljának (ζ -potenciál) mérésén keresztül szereztünk információkat 7,2-es pH értéken. A citrátos minták esetén azt figyeltük meg, hogy a méret növekedésével a részecskék kolloidstabilitása egyre erősebbé vált, ami abban mutatkozott meg, hogy az átlagos hidrodinamikai átmérők egyre közelebbi értékeket vettek fel a TEM-en látott primer részecskeméretekhez viszonyítva, illetve egyre alacsonyabb (abszolútértékben magasabb) zéta-potenciálokat mértünk. A negatív potenciálértékeket a felületi citrát csoportok deprotonálódásából származó karboxilát funkciók eredményezték, az értékek csökkenése pedig két különböző, a részecskeméret növekedéséhez köthető okból történt. Egyfelől, a szintézislépések során az ezüst és citrát-ionok koncentrációinak aránya közel azonos volt, így a méret növekedésével ellentétesen csökkenő fajlagos felület egységnyi részére több negatív töltés juthatott. Mivel azonban a citrát ionok deszorpciója, illetve kicserélődése ismert jelenség,¹⁷³ önmagában a citrát csoportok mennyisége nem ad elégséges magyarázatot a tapasztalatainkra. A magyarázat másik aspektusa, hogy az aggregációra való hajlam fordítottan arányos a mérettel a nano tartományban; a nagyobb részecskék fajlagos felülete, és ezáltal felületi energiája kisebb, így a termodinamikai minimumra való törekvésük is kevésbé lesz erélyes, mint az azonos anyagi minőségű, de kisebb részecskéknek. Ez azonban nem felel meg a DLVO elmélet klasszikus elképzeléseinek, ahol a vonzó kölcsönhatások nagysága egyenesen arányos a részecskemérettel, ellentmondásokat eredményezve nanorészecskék esetén.¹⁷⁴ Az ellentétek okát Hotze és munkatársai a matematikai modellek hiányosságaira vezetik vissza, amelyek sok esetben síknak tekintik a részecskefelszínt, ami a nano mérettartományban már komoly különbségeket eredményezhet,¹⁰ míg Wiese és Healy

maximumgörbéként vélekednek az aggregációs hajlam és a részecskeméret kapcsolatáról és abban látják az ellentmondás magyarázatát, hogy a DLVO elmélet a kinetikai tényezőket helyezi előtérbe az energetikai tényezőkkel szemben, amelyek nanorészecskék esetén ugyancsak előtérbe kerülnek.¹⁷⁵ Ezek a matematikai modellek azonban folyamatosan fejlődnek, és egyre több publikáció születik, amelyekben a DLVO elmélet a kisméretű nanorészecskéket tartalmazó rendszerekre is sikeresen alkalmazhatóvá válik. He és munkatársai például hematit nanorészecskék kísérleti zéta-potenciál értékeinek segítségével modellezni tudták a DLVO potenciálgörbe lokális maximumának növekedését a részecskék méretével, amely a kísérleteik során beigazolódott és fordított arányosságot figyeltek meg a részecskék mérete és kolloidstabilitása között.⁷⁵

A polivinil-pirrolidonnal stabilizált minta (AgNP@PVP₁₀) esetén abszolútértékben alacsonyabb ζ -potenciált, és magasabb D_h -t tapasztaltunk, mint a citráttal stabilizált részecskék esetén. Az értékek alapján a PVP-s minta alap esetben nagyobb aggregátumokat képez, mint a citrátos társai, a hosszútávú kolloidstabilitásról azonban nem tudtunk releváns következtetéseket levonni a ζ -potenciál alapján, hiszen a mintában sztérikus stabilizáló mechanizmusok voltak a meghatározók, így az érték mindössze referenciapontként szolgált. Végezetül a zöld teás AgNP@GT₁₀ adatai hasonlóságot mutattak mind az elektrosztatikus, mind a sztérikus stabilizáció során látott eredményekkel, alátámasztva a tea mátrix elektrosztérikus kölcsönhatásait. Egyfelől a PVP-s mintához hasonlóan magasabb kiindulási hidrodinamikai átmérőt tapasztaltunk, amelyet a TEM felvételen is látható, szerves mátrixba ágyazódott részecske agglomerátumok jelenléte is jól szemléltet, másfelől a citráttal stabilizált mintákhoz hasonlóan, a biológiai mátrix negatív töltéssel rendelkező funkciós csoportjai (pl. tiolát, fenolát csoportok) erős elektrosztatikus taszító kölcsönhatásokat eredményeztek, nagy negatív zéta-potenciált generálva.

Az elsődleges kémiai karakterizáció eredményei alapján az öt különböző nanorészecske szol előállítása sikeresnek bizonyult. Olyan szintézismódszereket kerestünk, amelyek segítségével közvetlenül nagyban hasonló, csak kívánt tulajdonságok mentén eltérő részecskéket kapjunk, hiszen a releváns, nanotoxikológiával foglalkozó szakirodalom publikációi jellemzően utólag már nem módosítják a vizsgálandó részecskéket. Az eredmények összegzése után úgy döntöttünk, hogy az enyhe eltérések ellenére, az olyan meghatározó tulajdonságok, mint az anyagi minőség, morfológia és kristályszerkezet minden részecskére nézve megfelelő hasonlóságot mutatott, és megkezdődhetnek a kolloidstabilitás vizsgálatai.

5.2. Aggregációs vizsgálatok

A következő fejezetekben az áttekinthetőség érdekében a méret, illetve stabilizálószer változtatása mentén végzett összehasonlítások külön alfejezetekben kerülnek tárgyalásra, ezért az AgNP@C₁₀-es minta eredményei kétszer szerepelnek a dolgozat ábráin. Reményeim szerint ez a megoldás áttekinthetőbbé teszi a dolgozatban bemutatott eredményeket.

5.2.1. A pH hatása az ezüst nanorészecske aggregációra

5.2.1.1. Különböző részecskeméretek mellett

Mindhárom különböző méretű AgNP@C minta hasonlóképpen reagált a pH változására az átlagos hidrodinamikai átmérő és zéta-potenciál eredmények összehasonlítása alapján (12. ábra). Az erősen savas kémhatás (pH 3) a minták ζ -potenciálját az idő előrehaladtával 0 mV körüli értékre emelte, amely mikronos nagyságrendű aggregátumok képződéséhez vezetett. A kémhatás emelkedésével a részecskeminták zéta-potenciáljai egyre nagyobb negatív értékeket vettek fel, jelentősen lecsökkentve az aggregátumok méretét, végül lúgos kémhatáson (pH 9) az összes citráttal stabilizált minta kolloidálisan stabilisnak bizonyult, melyet az alacsony értéken maradó hidrodinamikai átmérők és ζ -potenciálok is alátámasztottak a kísérletsorozat minden pontjában.

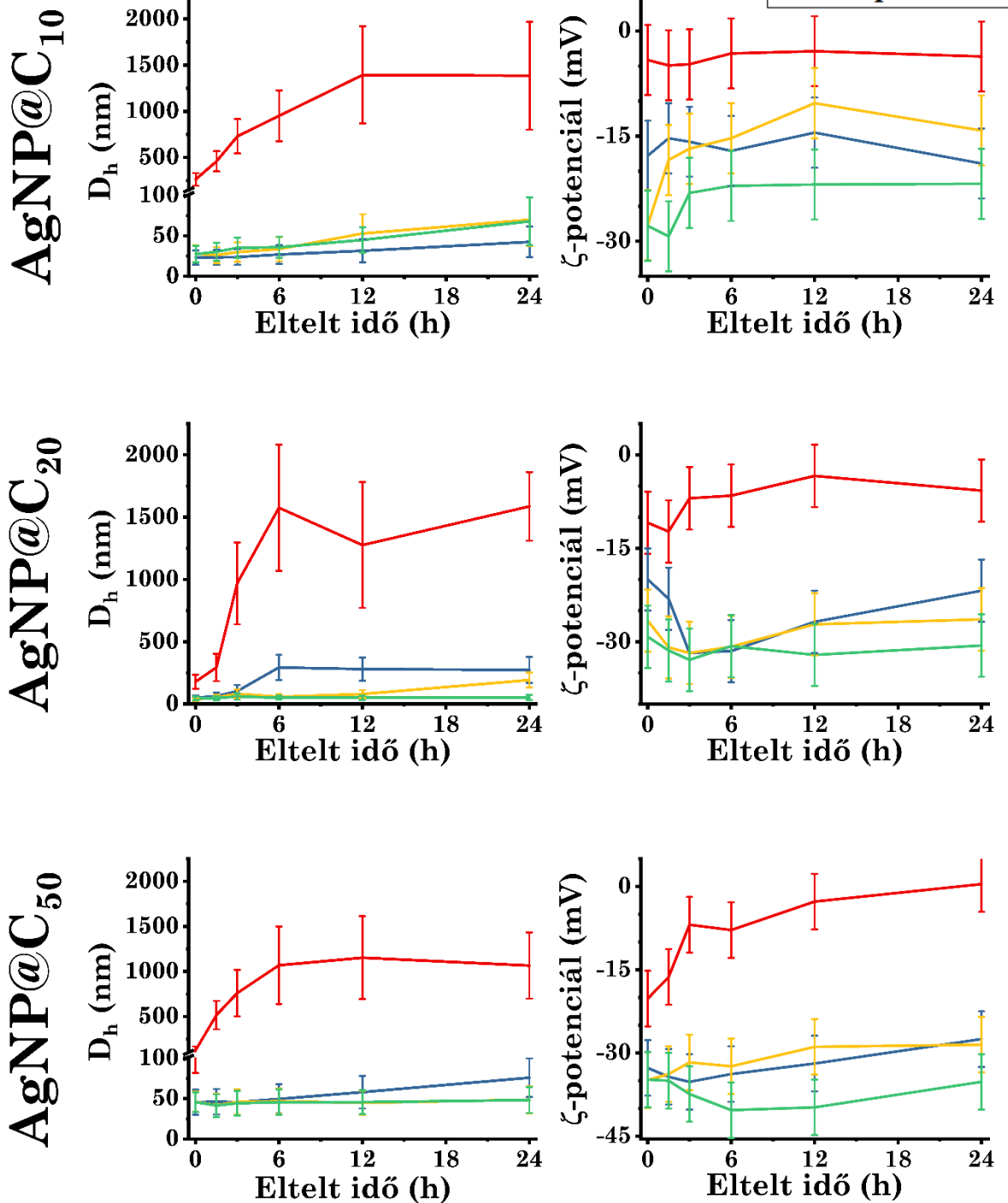
A hasonló tendenciák mellett azonban különbségeket is megfigyeltünk a részecskék viselkedésében. A legkisebb, AgNP@C₁₀ kolloid volt a legérzékenyebb a kémhatásra. A pH beállítása után azonnal módosulásokat tapasztaltunk a ζ -potenciál értékében, jól elkülönülő sorozatokat eredményezve, amelyek nem változtak számottevően a 0 órás időpont után. Ezalól kivételt képezett a semleges kémhatáson felvett trendvonal, ahol a stabilitás elméleti határnak tekinthető -30 mV-ról lassú emelkedést tapasztaltunk, amely 3 óra elteltével az enyhén savas (pH 5) kémhatáson mért trendvonal -15 mV-os szintjére emelkedett, arra utalva, hogy ez a kolloid rendszer már semleges pH-n sem stabilis kolloidálisan. A legkisebb átlagos részecskemérettel rendelkező mintával szemben, az AgNP@C₂₀ és AgNP@C₅₀ esetében a trendvonalak pH 5 és 9 között lényegében együtt futottak és csak a pH 3-on mért eredmények mutattak jelentős potenciál emelkedést, azonban ameddig a 20 nanométeres részecskék ζ trendjei a -30 mV-os határ körül mozogtak, addig AgNP@C₅₀ esetében pH 5 fölött a zéta-potenciál értékek túllentek a stabilitási határon. Minthogy pH 5 és 9 között az AgNP@C₅₀ jelzésű részecskék demonstrálták az adott kémhatáson mért legalacsonyabb kiindulási zéta-potenciálokat és D_h változásokat az idő

előrehaladtával, az a következtetés vonható le, hogy a három különböző részecskeméretű kolloid közül ez bizonyult a legellenállóbbnak a pH indukált részecskeaggregációval szemben.

Érdemes megfigyelni, hogy a legnagyobb primer részecskeméretük ellenére, az AgNP@C₅₀ részecskék alakították ki a legkisebb D_h-val rendelkező aggregátumokat pH 3-on 24 óra elteltével. Ezeket a végső értékeket elosztva a szintézisek után mért kezdő értékekkel (11. ábra), AgNP@C₁₀ esetén 50-szeres, AgNP@C₂₀ esetén 42-szeres, AgNP@C₅₀ esetén pedig mindössze 22-szeres relatív aggregátumméret növekedést tapasztalunk, szemlélítve a részecskeméret-növekedés aggregációval szembeni ellenállóképességre gyakorolt jótékony hatását.¹⁷⁶

Az erősen aggregálódott minták esetében meglehetősen nagy szórás értékeket tapasztaltunk, így az eredmények pontosságának szemlélítése érdekében megvizsgáltuk a mérési pontok polidiszperzitási indexeit (PdI) is (1. melléklet táblázat). A PdI egy 0 (tökéletesen monodiszperz rendszer) és 1 (teljesen polidiszperz rendszer) közötti értéket felvevő szám, amely a folyadéktérben lévő objektumok méretének eloszlását jellemzi. Minél nagyobb a PdI értéke, a D_h adatok pontossága annál alacsonyabb, 1-nél pedig már nem alkalmazhatjuk hatékonyan a DLS által meghatározott hidrodinamikai átmérőt, amely a kísérleteinket megghiúsította volna. Az eredményekből leolvasható, hogy már a referencia AgNP szolok alapvetően közepesen polidiszperz rendszereknek számítanak, amely a két kisebb részecskecsoport esetén romló tendenciát is mutatott a háttérektrólit koncentráció hatása miatt. Erősen savas pH-n a polidiszperzitási indexek növekedését tapasztaltuk az idő előrehaladtával mindhárom esetben, továbbá a PdI váltoásaiban is megmutatkozott a nagyobb részecskék ellenállóképessége az aggregációval szemben, hiszen itt tapasztaltuk a legkisebb változásokat. A mérési módszer pontosságát tekintve meg kell jegyeznünk, hogy a pH 3-on mért aggregáció hatására (AgNP@C₁₀ esetében már a referencia esetén is) rendkívül magas, 0,7-nél is nagyobb indexeket is mértünk. Habár erős aggregáció esetén a magas PdI-k miatt nem vonhatunk le messzemenő következtetéseket az aggregátumok pontos méreteiről, az eredményeink megfelelőnek mutatkoztak ahhoz, hogy a kísérleti rendszeren belül összehasonlíthassuk az ezüst nanorészecske minták aggregációs tendenciáit.

Tényező: pH
Változó: Méret

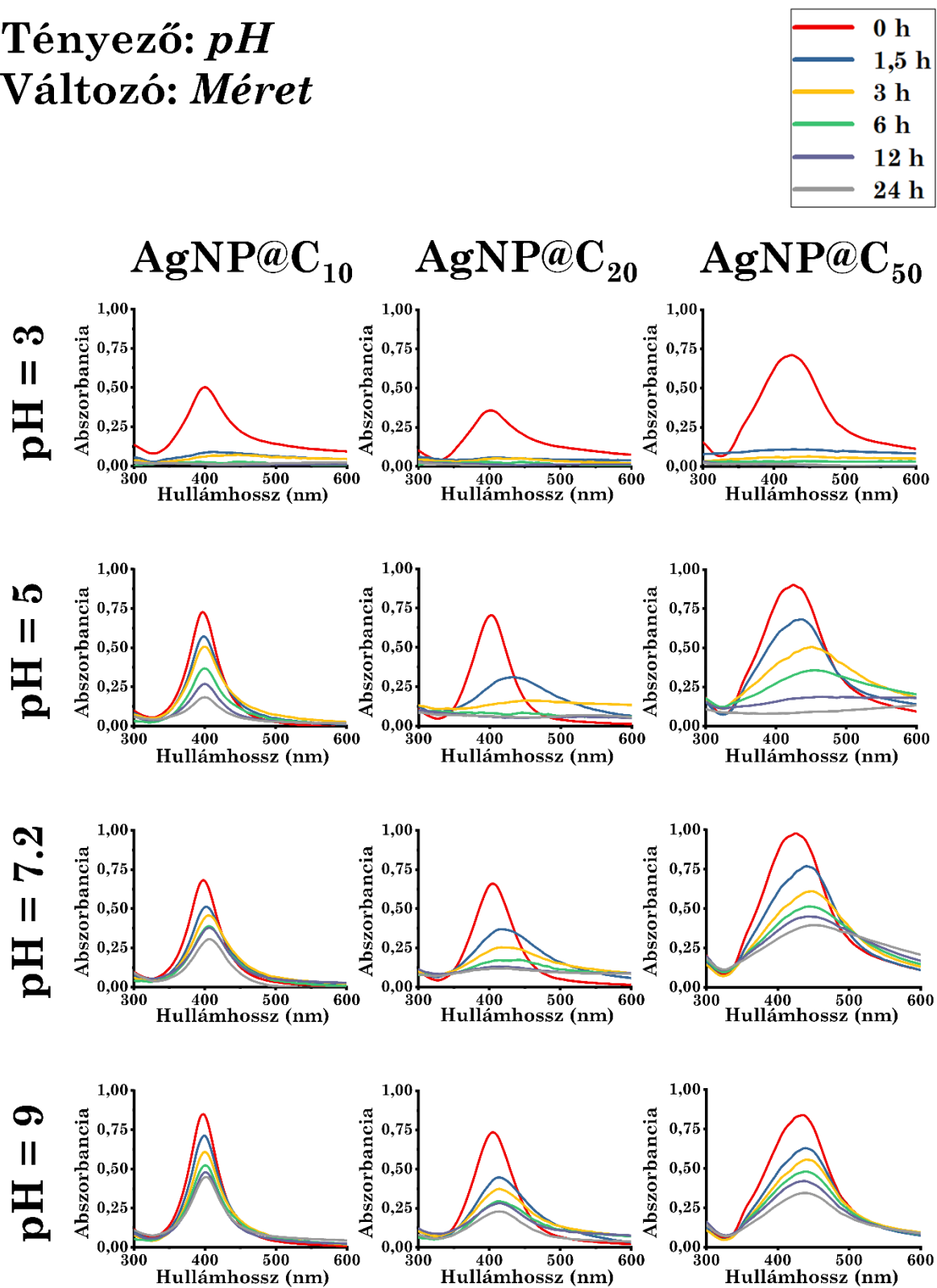


12. ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérőinek és zéta-potenciáljainak változása különböző pH értékek mellett

A DLS és ζ -potenciál vizsgálatok során megfigyelt pH-függő aggregációs viselkedés a részecskék felületi plazmon rezonanciájának változásában is megnyilvánult. A minták UV-Vis spektrumait a 13. ábra szemlélteti, amely alapján elmondhatjuk, hogy a részecskék aggregációját a hozzájuk tartozó SPR csúcsok intenzitásának erőteljes csökkenése, illetve bizonyos esetekben a csúcsok vöröseltolódása kísérte. Az adott méretekhez tartozó oszlopokon belül az intenzitás-csökkenés mértéke összhangban volt a DLS mérések során tapasztalt aggregáció mértékével, azaz minél nagyobb aggregátumok alakultak ki (minél savasabb volt a közeg), annál gyorsabban csökkent, és annál alacsonyabb értékeket vett fel a minták elnyelése. Ez egyfelől magyarázható, a mikronos aggregátumok megjelenésével és ülepedésével, illetve azzal, hogy az aggregáció révén a részecskék plazmonjai átfednek egymással, így a szabad részecskékre jellemző tulajdonságok kevésbé fejeződtek ki.¹⁵⁶

A különböző méretekhez tartozó UV-Vis adatokat összehasonlítva elsőre ellentmondásosnak tűnő tendenciát figyeltünk meg: a közepes méretű AgNP@C₂₀ kolloid oldat bizonyult az optikailag legérzékenyebbnek a kolloidstabilitás megváltozására, ameddig a két másik minta ellenállóbbnak mutatkozott. Az SPR-rel foglalkozó kutatások alapján az 50 nm-es részecskeátmérő egyfajta elméleti határnak tekinthető, amely alapján megkülönböztethetjük a részecskéket a dielektromos tulajdonságaik alapján.¹⁵⁶ Míg az 50 nanométernél kisebb részecskék (AgNP@C₁₀ és AgNP@C₂₀) egyszerű dipólusokként értelmezhetők, addig a határ körüli és annál nagyobb részecskék (AgNP@C₅₀) összetett dielektromos tulajdonságokkal rendelkeznek, mivel a rezonancia sávjaik multimodálisan felhasadnak. A kisebb, egyszerű dipólusokként értelmezhető részecskék esetén a plazmonok könnyen átfedhetnek egymással; minél nagyobbak a részecskék, az átlapolódásból keletkező plazmonok is annál nagyobbak lesznek, ami magyarázattal szolgálhat az AgNP@C₂₀-as aggregációs vöröseltolódására és érzékenységre. Az 50 nm-es határon túl azonban a plazmonok átfedése sokkal összetettebb a multimodális dipólusok kölcsönhatásai miatt, ami (a minta stabilitása mellett) magyarázatot adhat az AgNP@C₅₀ minta kolloidstabilitás-csökkenéssel összefüggő enyhébb optikai változásaira.

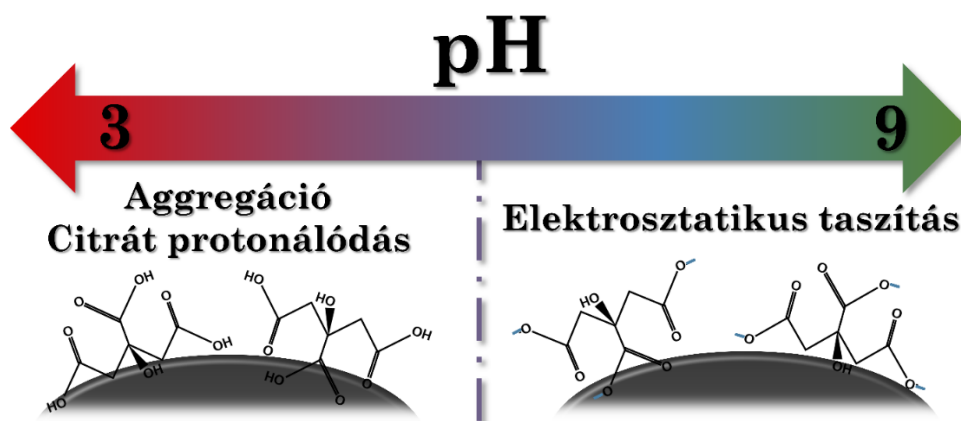
Tényező: pH
Változó: Méret



13. ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék UV-Vis spektrumainak változása különböző pH értékek mellett

A megfigyeléseink azt igazolták, hogy kísérleti körülményeink között a kémhatásnak jelentős befolyása van a citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék kolloidstabilitására. Ezekben a rendszerekben a nanorészecskék stabilitását a felületükre adszorbeálódott citrát csoportok negatív töltésű karboxilát (-COO^-) funkciói biztosítják, amelyek a Le Chaterier – Braun elv értelmében sav-bázis egyensúlyt alakítanak ki a környezetükkel. Savas pH-n, ahol a H^+ ionok koncentrációja megemelkedik, az egyensúly a karboxilát csoportok protonálódásának kedvez, a -COOH csoportok semleges töltése miatt pedig lecsökken a zéta-potenciál abszolút értéke és ezzel a részecskék közötti elektrosztatikus tasztítás mértéke is, aggregációt idézve elő (14. ábra). Lúgos közeg esetében ezzel szemben a karboxil csoportok könnyebben deprotonálódhatnak, ami végeredményben a részecskék kolloidstabilitásának kedvez. A citrát csoportok protonáltságához köthető zéta potenciál eredményeink jól tükrözték a citromsav savi disszociációs állandóinak értékeit ($\text{pK}_{\text{a}1}=3.1$, $\text{pK}_{\text{a}2}=4.7$, $\text{pK}_{\text{a}3}=6.4$), amelyek alapján belátható, hogy pH 3-on a citrát-ionok mindhárom karboxil-csoportja döntően protonált állapotban van, 5-ös pH-n már iononként két karboxil-csoport jellemzően deprotonálódott, míg fiziológias és lúgosabb pH-n a citrát-ionok többsége teljesen disszociált állapotban voltak, lecsökkentve a részecskék ζ értékeit.¹⁷⁷

A részecskék méretének hatása kapcsán, az 5.1.-es fejezetben megfigyelt méretnövekedésből kialakuló erősebb kolloidstabilitás a pH zavaró hatása mellett is érvényesült, a nagyobb részecskék kevésbé aggregálódtak savas pH-n. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy olyan felhasználások esetén, amelyeknél a részecskék szélsőséges pH viszonyoknak vannak kitéve, a részecskeméret növelésével ellenállóbb rendszereket alakíthatunk ki.



14. ábra A pH változásának hatása az ezüst nanorészecskék elektrosztatikus, citrát csoportokkal kialakított stabilizációjára

5.2.1.2. Különböző stabilizáció mellett

A különböző stabilizálószeres mérőssorozatokban hozzávetőlegesen 10 nanométer átmérőjű ezüst nanorészecskéket vizsgáltunk. Ahogy a 15. ábra eredményei alapján látható, az elektrosztatikus stabilitást az előző fejezetben is bemutatott, citrát csoportokkal stabilizált szol (AgNP@C₁₀) képviselte, a sztérikus kölcsönhatásokat polivinil-pirrolidonnal borított részecskékkel jellemeztük (AgNP@PVP₁₀), az elektrosztérikus stabilizációt pedig zöld tea extraktummal előállított részecskék alkalmazásával modelleztük (AgNP@GT₁₀). Elektrosztatikus esetben a már ismertetett, erős pH dependenciát tapasztaltuk, amely a karboxil csoportok sav-bázis egyensúlyával magyarázható.

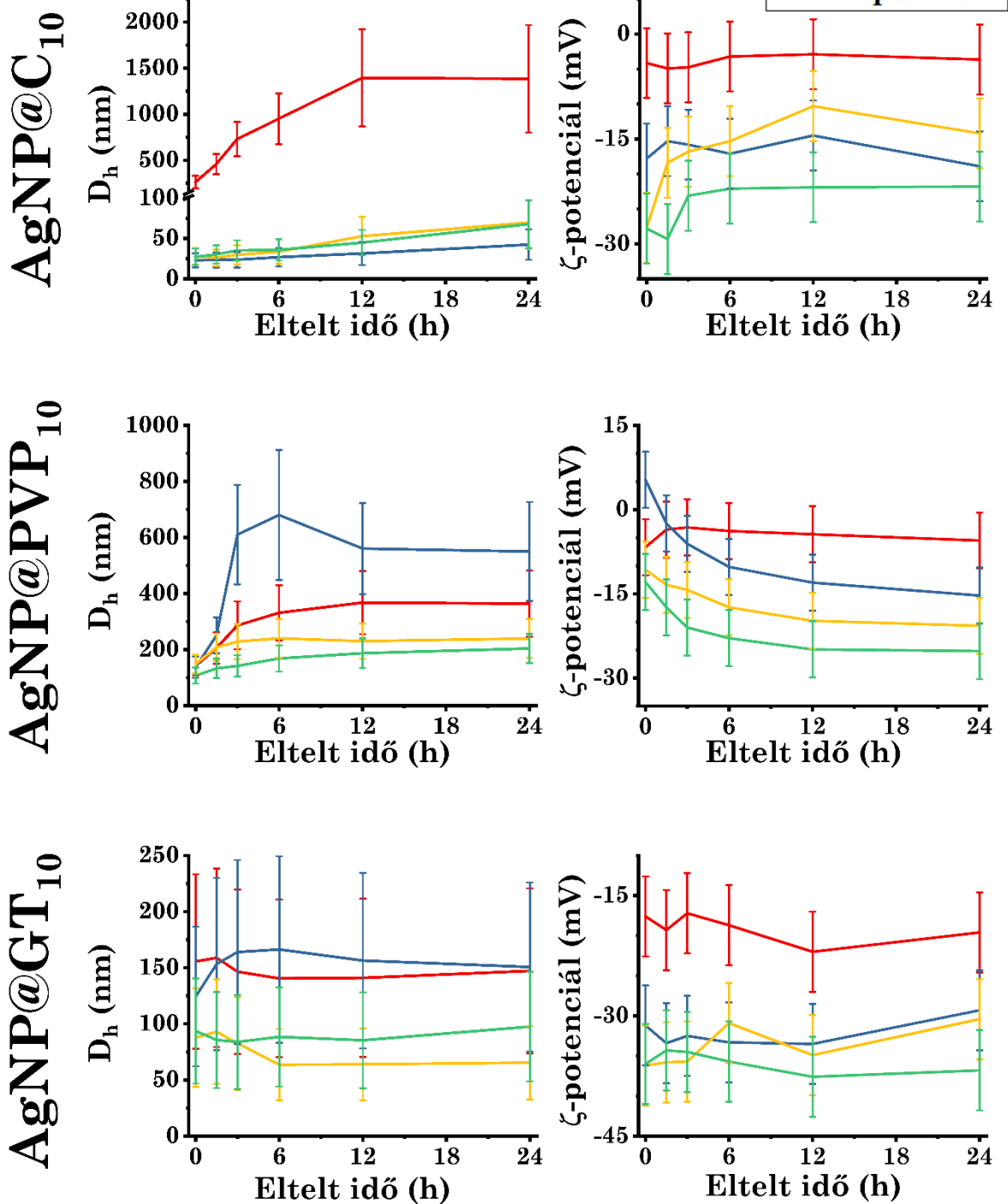
Habár az 5.1.-es fejezet alapján, az AgNP@PVP₁₀ minta részecskéi viszonylag magas, nagyjából 150 nm-es átlagos hidrodinamikai átmérővel rendelkeztek, mégis sokkal jobban megtudták őrizni a kiindulási méretüket, mint a citrátos minta ezüst nanorészecskéi, és még a legnagyobb aggregátumok sem érték el a mikronos határt ($D_{h(max)} = 680 \pm 230$ nm). A mérőssorozat érdekessége, hogy ameddig a pH 3, 7,2 és 9-en mért hidrodinamikai átmérők nem tértek el jelentősen egymástól és az erősen savas kémhatás is csak mérsékelt növekedést eredményezett, addig az enyhén savas, 5-ös pH-jú közegben kiugróan magas aggregátumméreteket tapasztaltunk, ráadásul mindemellett 3 óra elteltével negatívabb zéta-potenciálokat mértünk, mint 3-as pH esetén. Ennek a látszólagos ellentmondásnak a feloldására az UV-Vis eredményekkel közös értelmezés során lesz lehetőségünk.

Az AgNP@GT₁₀ esetén az előző két mintát ötvöző erős kölcsönhatásoknak köszönhetően egy meglehetősen ellenálló rendszert kaptunk. Az aggregáció pH-függő trendvonalai a citrátos minta logikáját követték, azaz lúgos kémhatáson alacsonyabb hidrodinamikai méreteket és abszolút értékben nagyobb ζ -potenciálokat mértünk, mint savas környezetben. A változások mértéke azonban jelentősen elmaradt az AgNP@C₁₀-es szol esetén tapasztaltaktól, a legnagyobb D_h értékek is 150 nm körüli értékeket vettek fel, ami az AgNP@PVP₁₀ esetén tapasztalt erős sztérikus kölcsönhatások jelenlétére utalt.

A minták PdI értékei alapján (1. melléklet táblázat) az AgNP@C₁₀ és AgNP@PVP₁₀ minták kezdeti polidiszperzitása hasonló volt (0,28 illetve 0,20), míg a zöld tea extraktummal stabilizált részecskék jóval magasabb (0,66) PdI-t produkáltak. Semleges pH esetén ezek az értékek a sztérikus, illetve elektrosztérikus szolok esetén nem változtak jelentősen, ameddig a citrátos részecskék indexe az előző alfejezetben leírtak szerint folyamatosan emelkedett. A referencia

minták viselkedésére a szintézismódszerek szolgálhatnak magyarázattal; a citrátos, illetve PVP-s részecskék meglehetősen hasonlóak voltak, a TEM felvételek alapján (10. ábra) jól elkülöníthető részecskék keletkeztek, zöld tea esetén azonban a biológiai mátrixban lévő részecskék is jelentős mennyiségben voltak jelen, így a kezdeti diszperzitást ezek a véletlenszerű mérettel és morfológiával rendelkező képződmények is befolyásolták. A savas pH hatására az erősen aggregálódó AgNP@C₁₀ részecskék PDI-je jelentősen emelkedett, az AgNP@PVP₁₀ minta változatlansága pedig a polidiszperzitási indexek stabilitásában is megmutatkozott. Érdekes módon, a zöld teás minta esetén az enyhe aggregáció ellenére a PDI értékei jelentősen csökkentek. Erre újfent a rendszerben található szerves mátrix lehet a magyarázat, amely elképzelésünk szerint egyfajta hordozóként viselkedhetett a mérések során és a szabad, de stabilitásukat veszítő részecskék aggregáció helyett inkább ezekre adszorbeálódhattak, ezzel csökkentve a teljes rendszer polidiszperzitását.

Tényező: *pH*
Változó: *Stabilizálószer*

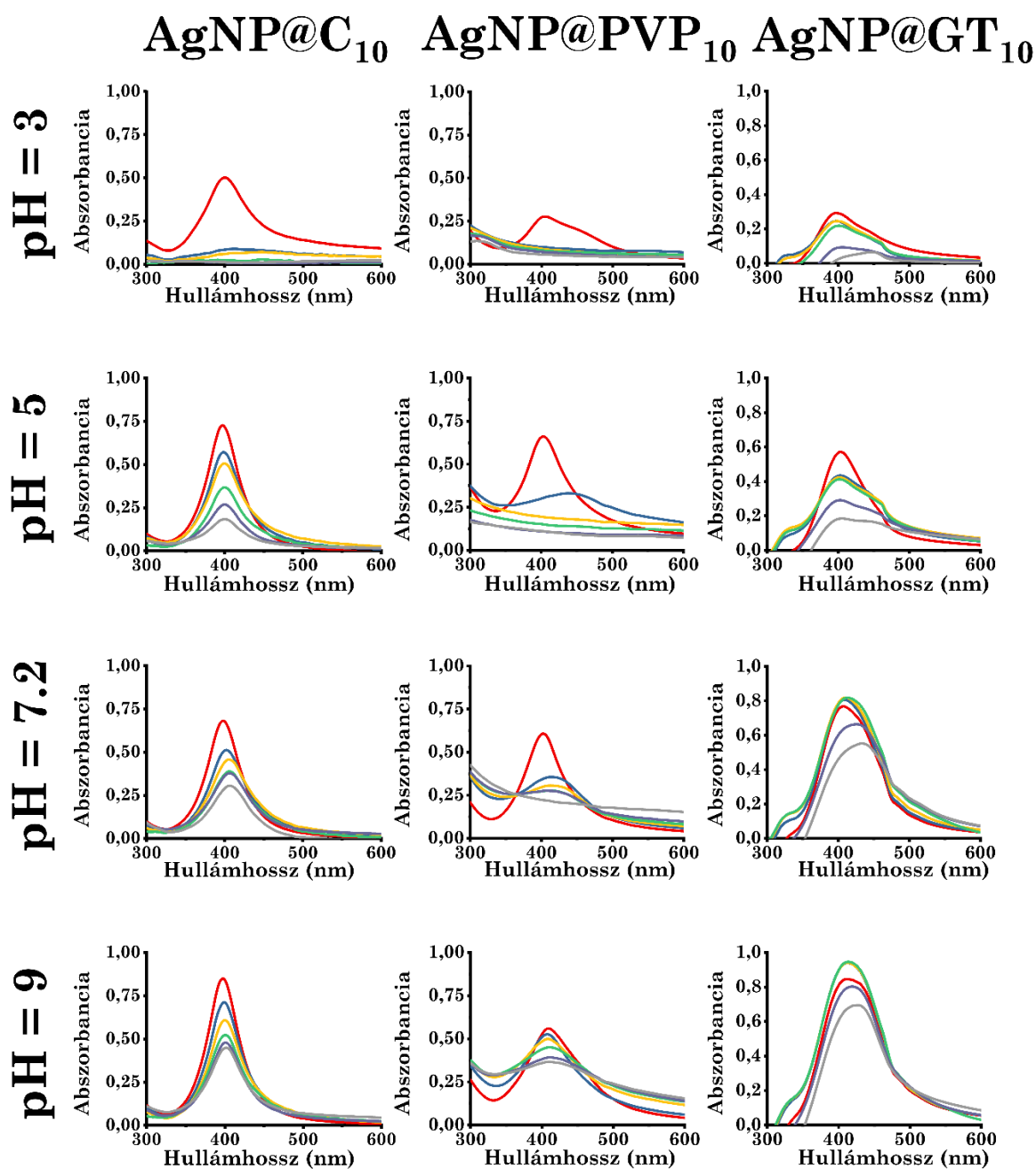
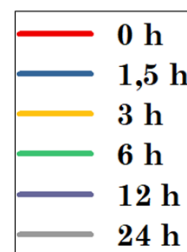


15. ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérőinek és zéta-potenciáljainak változása különböző pH értékek mellett

A stabilizációs mechanizmusokat összehasonlító kísérletek során az UV-Vis eredmények (16. ábra) jelentősége felértékelődött annak köszönhetően, hogy bizonyos DLS-sel és ζ méréssel tapasztalt, elsőre ellentmondásosnak tűnő jelenségekre magyarázattal szolgáltak. Az SPR változások a citrátos nanoezüst minta esetében a már említett módon támogatták a DLS és zéta mérések eredményeit, a PVP-vel stabilizált részecskék esetében azonban a minták elnyelési spektrumai új információkat is szolgáltatottak. A legszembetűnőbb a pH csökkenésével kialakuló jelentős SPR csökkenés volt, ami a DLS eredmények alapján nem köthető össze aggregációval. Ezen felül, a viselkedés együtt jelentkezett egy olyan abszorbancia változással is, amit csak az AgNP@PVP₁₀ esetén tapasztaltunk: sok esetben a karakterisztikus SPR csúcsok és a közeli UV-ban található, d-d átmenetek által előidézett elnyelési régió közötti, 350 nm-nél található elnyelési minimum intenzitásának megemelkedését tapasztaltuk. A kísérletek során a savas pH beállítása sósav oldat segítségével történt, savas irányba emiatt folyamatosan nőtt a kloridionok koncentrációja, így a viselkedés legkézenfekvőbb magyarázatnak az ezüst-klorid csapadék keletkezése bizonyult. A 17. ábra A) részén látható illusztráció azt szemlélteti, hogy az ezüst-klorid, és az elkészített részecskék elnyelési spektrumainak összege jól közelíti az aggregációs vizsgálatok eredményeiként kapott elnyelési görbéket, ráadásul az AgCl képződés megmagyarázza a ζ -potenciál trendek enyhe csökkenését a 24 óra alatt, amely a szakirodalom alapján a nyírási síkon mérhető potenciált negatív irányba befolyásolja.¹⁷⁸

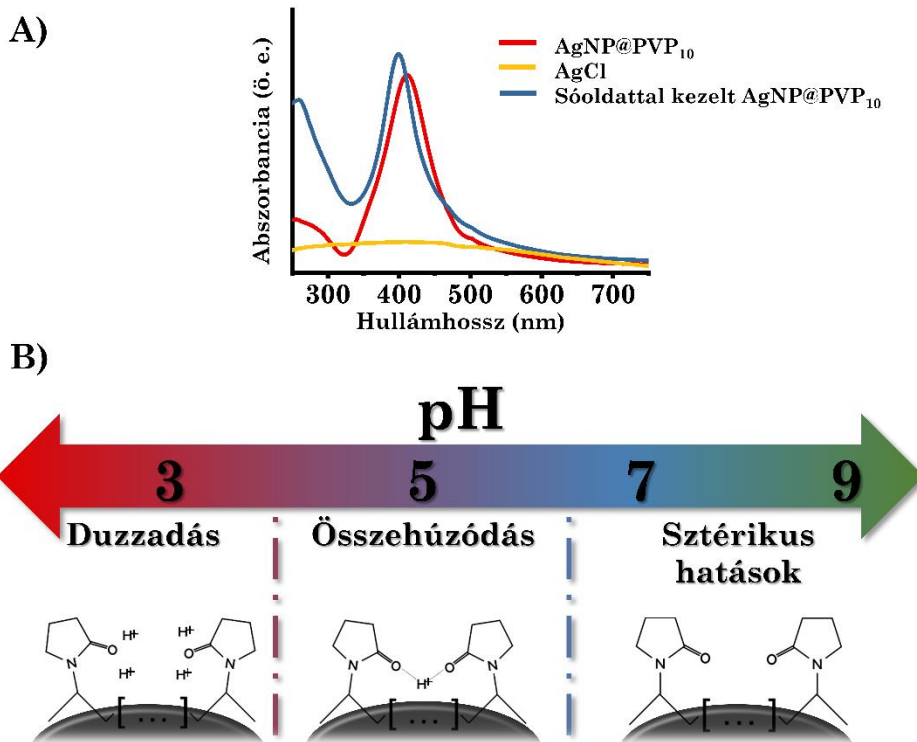
A zöld teás, AgNP@GT₁₀ részecskék SPR spektrumainak változása jól beleillett az eddigi pH függő tendenciákba, a savas közegben erőteljesebb változásokat tapasztaltunk, mint lúgosban. Sajnálatos módon ennél a mintánál azonban számolnunk kellett azzal a problémával, hogy nem tudtunk megfelelő háttérrel felvenni a minták vizsgálatához, így sok esetben negatív elnyelési értékeket is tapasztaltunk. A megfelelő háttér kialakítását egyfelől gátolta, hogy a nanorészecske szintézis során lejátszódó kémiai reakciók a tea összetételére is hatással vannak, ezeket a komponensbéli változásokat pedig nem tudtuk modellezni. Ezen felül nem feledkezhetünk meg a tea indikátor tulajdonságairól sem, amelyek szintén nehezítették a méréseket. A bizonytalanságok ellenére a spektrumok így is jelzésértékűek voltak a részecskéket érintő felületi kölcsönhatások értelmezésében.

Tényező: *pH* Változó: *Stabilizálószer*



16. ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék átlagos UV-Vis spektrumainak változása különböző pH értékek mellett

A kémhatás különböző stabilizálószerekre gyakorolt hatását összegezve azt mondhatjuk, hogy az elektrosztatikus, citrát csoportokkal stabilizált részecskék a karboxil csoportok protonálódása révén kolloidális szempontból meglehetősen kiszolgáltatottak a pH változásának. Ezzel szemben a sztérikusan stabilizált AgNP@PVP₁₀ sokkal ellenállóbbnak bizonyult kolloidstabilitás szempontjából. A PVP-vel létrehozott stabilizáció kémhatásfüggő változását a 17. ábra B) része mutatja be, az egyszerűség kedvéért hidrogén ionokkal szemlélítve a folyamatokat. Mint ahogy az ábrán látható, semleges és lúgos pH-n az általános sztérikus taszítás érvényesül, erősen savas pH-n pedig a pirrolidon csoportok körül feldúsulnak a H⁺ ionok, a polimer duzzadását eredményezve.¹⁷⁹ Enyhén savas pH-n azonban, amikor a hidrogén ionokból csak enyhe felesleg van, a pirrolidon csoportok egymás közelébe koordinálódnak amely az enyhe aggregációt eredményezte.¹⁸⁰ A nagyfokú kolloidstabilitás ellenére azonban a részecskék kémiai stabilitása megkérdőjeleződött, hiszen AgCl csapadék képződésére utaló jeleket tapasztaltunk. Végezetül a zöld teás minta a két előző mechanizmust ötvözve kiváló kolloidális és kémiai stabilitást demonstrált, hiszen a részecskék szélsőséges pH viszonyok között is ellenálltak az aggregációnak, továbbá kémiai degradációra utaló jeleket sem tapasztaltunk.



17. ábra A) Ezüst-klorid csapadék képződése AgNP@PVP₁₀ részecskékből fiziológiás sókoncentráció mellett B) A pH változásának hatása az ezüst nanorészecskék sztérikus, PVP-vel kialakított stabilizációjára

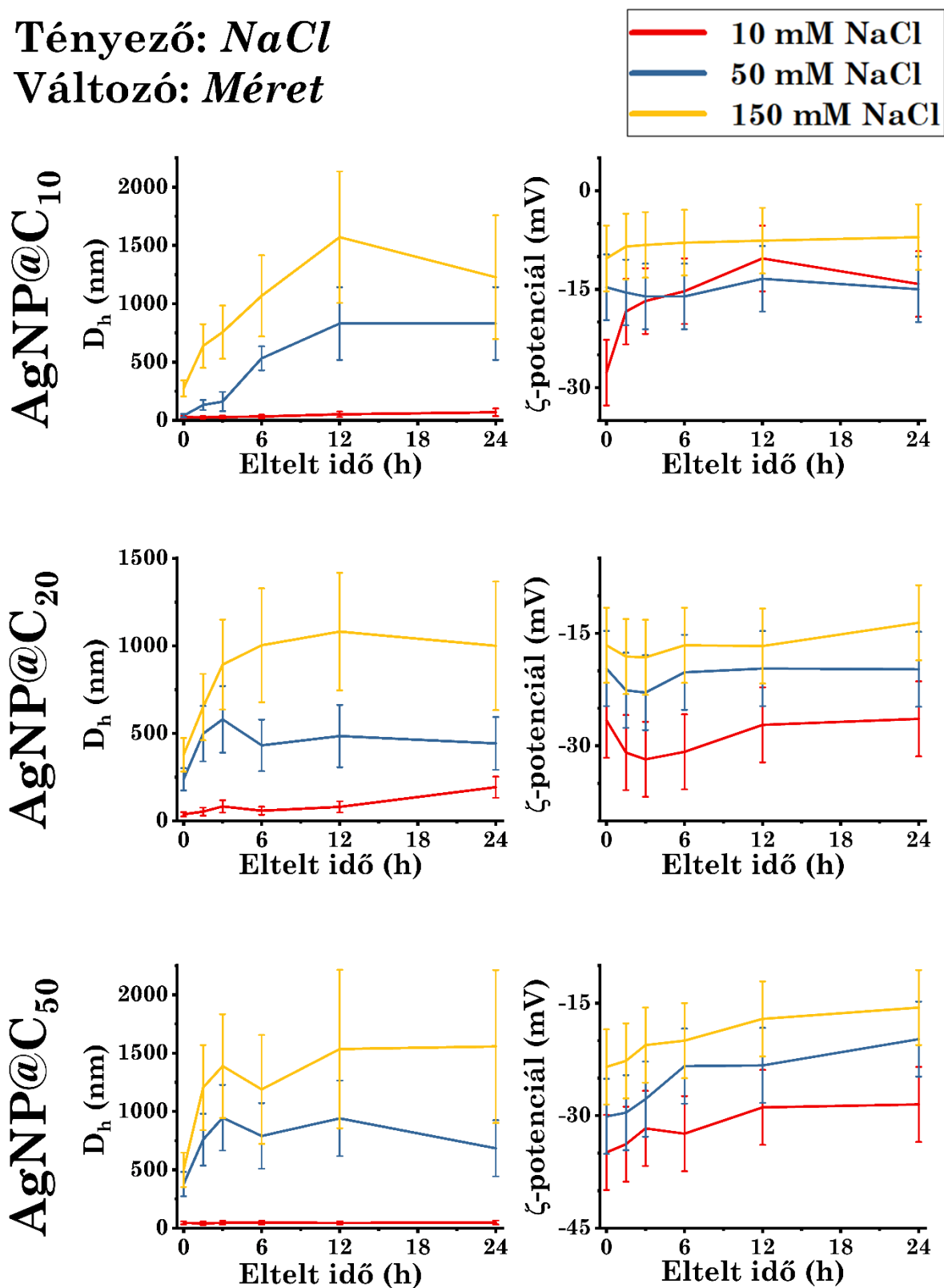
5.2.2. A nátrium-klorid hatása az ezüst nanorészecske aggregációra

5.2.2.1. Különböző részecskeméretek mellett

A 18. ábrán a különböző méretű ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérője és zéta-potenciáljai szerepelnek emelkedő sókoncentrációk mellett, 7,2-es pH érték mellett. A három minta összehasonlításakor a ζ -potenciálok alapján látható, hogy a nagyobb részecskeméret ismételt nagyobb ellenállóképességet biztosított. A legkisebb, 10 nm-es minta esetén már 10 mM NaCl is elegendő volt a stabilitás enyhe csökkenéséhez, hiszen a zéta trendvonal 1,5 óra után hibahatáron belül már együtt haladt az 50 mM-os koloid körülbelül -15 mV-os értékeivel. Ezzel szemben a 10 mM-os NaCl koncentráció a 20, és 50 nm-es részecskék esetében nem módosította jelentősen a ζ értékeket, ráadásul mindkét minta esetén stabilnak mondható, -30 mV körüli (AgNP@C₂₀), illetve alatti (AgNP@C₅₀) eredményeket mértünk. A sókoncentráció megemlése 50, majd 150 mM-ra már elégséges volt a zéta-potenciálok abszolútértékeinek csökkentésére mindhárom koloid esetében, habár a nagyobb részecskék jobban megtartották negatív potenciáljaikat. Ezek az eredmények meggyilvánultak a minták átlagos hidrodinamikai

átmérőiben is; a növekvő sókoncentráció kedvezőtlennek bizonyult az aggregátumképződés szempontjából. Minden esetben időben emelkedő trendeket tapasztaltunk, amelyek mértéke az NaCl koncentrációval arányosan nőtt. A leglátványosabb emelkedéseket a lényegében fiziológiás sóoldatnak tekinthető 150 mM-os méréssorozatok esetén tapasztaltuk, ahol mindhárom szuszpenzióban 1000 nm feletti aggregátumokat detektáltunk. Ez az erős aggregáció a rendszerek polidiszperzitási indexeiben is megmutatkozott (1. melléklet táblázat), azonban ez nem volt olyan mértékű, amely a mérések összehasonlíthatóságát sértette volna. Az AgNP@C₁₀ és AgNP@C₅₀ kolloidok esetében a 24 órás mérési időpontokban a D_h látszólagos csökkenését tapasztaltunk, ez azonban mindössze a nagyobb aggregátumok ülepedésének köszönhető, illetve annak tudható be, hogy meghaladtuk a műszer felső mérési határát, hiszen a stabilitás javulását sem a ζ-potenciál, sem az UV-Vis eredmények (19. ábra) nem támasztották alá.

Tényező: *NaCl*
Változó: *Méret*

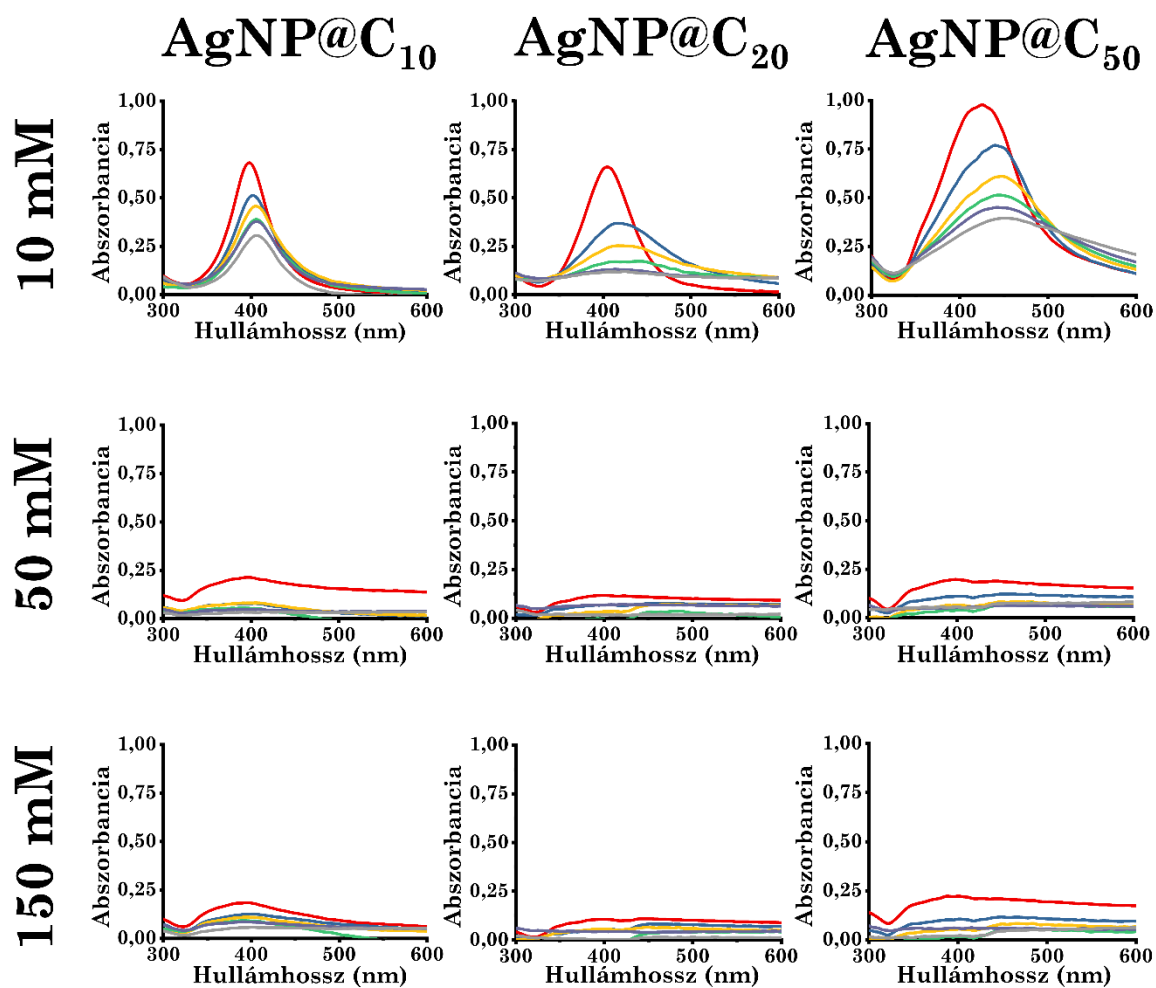
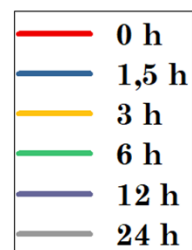


18. ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérőinek és zéta-potenciáljainak változása különböző NaCl koncentrációk mellett, 7,2-es pH értéken

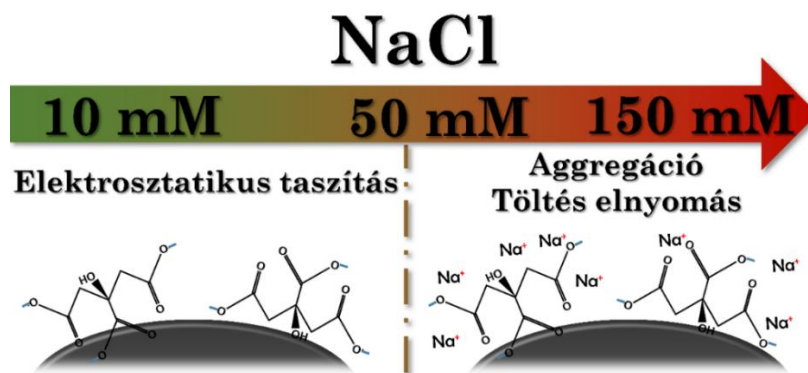
A 19. ábra elnyelési spektrumai mindhárom minta esetén gyors, és jelentős mértékű SPR intenzitás csökkenéseket demonstráltak; már 50 mM NaCl hatására is gyakorlatilag azonnal megszűnt a részecskék detektálható plazmon rezonanciája. Ez egyfelől a gyors aggregáció következménye, másfelől a sókoncentráció emelése a részecskék körüli közeg relatív permittivitását is megnöveli, ami szintén befolyásolni tudja a felületi plazmon rezonanciát.¹⁵⁶

A mérések összegzéseként elmondhatjuk, hogy a nátrium-klorid koncentráció megemelésének hatására hasonlókat tapasztaltuk, mint erősen savas kémhatás esetén, a mikronos aggregátumok megjelenése pedig arra utalt, hogy a fiziológiás ionerősség mérettől függetlenül kedvezőtlen a citráttal stabilizált ezüst nanorészecskék kolloidstabilitásának szempontjából. Ennek hátterében a rendszerekben nagy mennyiségben megjelenő Na^+ ionok állnak, amelyek könnyen a citrát ionok karboxilát csoportjai köré képesek koordinálódni, ezzel leárnyékolva a nyírási síkon lévő negatív töltéseket (20. ábra). A megfigyeléseink jól beilleszthetők a szakirodalomba a miénkhez hasonló nanoezüst rendszerekre meghatározott kritikus koagulációs nátrium klorid koncentrációk ismeretében (CCC_{NaCl}). Huynh és munkatársai átlagosan 71 nm-es citrát csoportokkal stabilizált részecskéiknél 47,6 mM-os CCC_{NaCl} -t határoztak meg, El Badawy csoportja pedig 70 mM-os kritikus sókoncentrációt mért 10 nanométeres részecskék esetén.^{47,181} Bizonyos esetekben kivételesen nagy, akár 300 mM-os CCC_{NaCl} -ről is beszámolnak egyes kutatások.¹⁸² He és munkatársai ezt a kimagasló értéket a saját fejlesztésű szintézis módszerüknek tulajdonították. A munkánk során végig törekedtünk olyan technikák és mennyiségek vizsgálatával foglalkozni, amelyeket bármelyik körülményre értelmezni tudtunk. Mivel a későbbiekben vizsgált rendszerek összetettsége nagymértékben növekedett, nem tűztük ki célul kritikus koagulációs koncentrációk meghatározását. Ennek ellenére az irodalomban megtalálható CCC-k alapján feltételezhetjük, hogy mind az 50 és 150 mM-os NaCl koncentrációk elégségesek lehetnek irreverzibilis aggregáció előidézéséhez, ami megmagyarázhatja a kolloidokban tapasztalt erőteljes változásokat.

Tényező: *NaCl*
Változó: *Méret*



19. ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék UV-Vis spektrumainak változása különböző NaCl koncentrációk mellett, 7,2-es pH értéken



20. ábra A NaCl koncentráció változásának hatása az ezüst nanorészecskék elektrosztatikus, citrát csoportokkal kialakított stabilizációjára

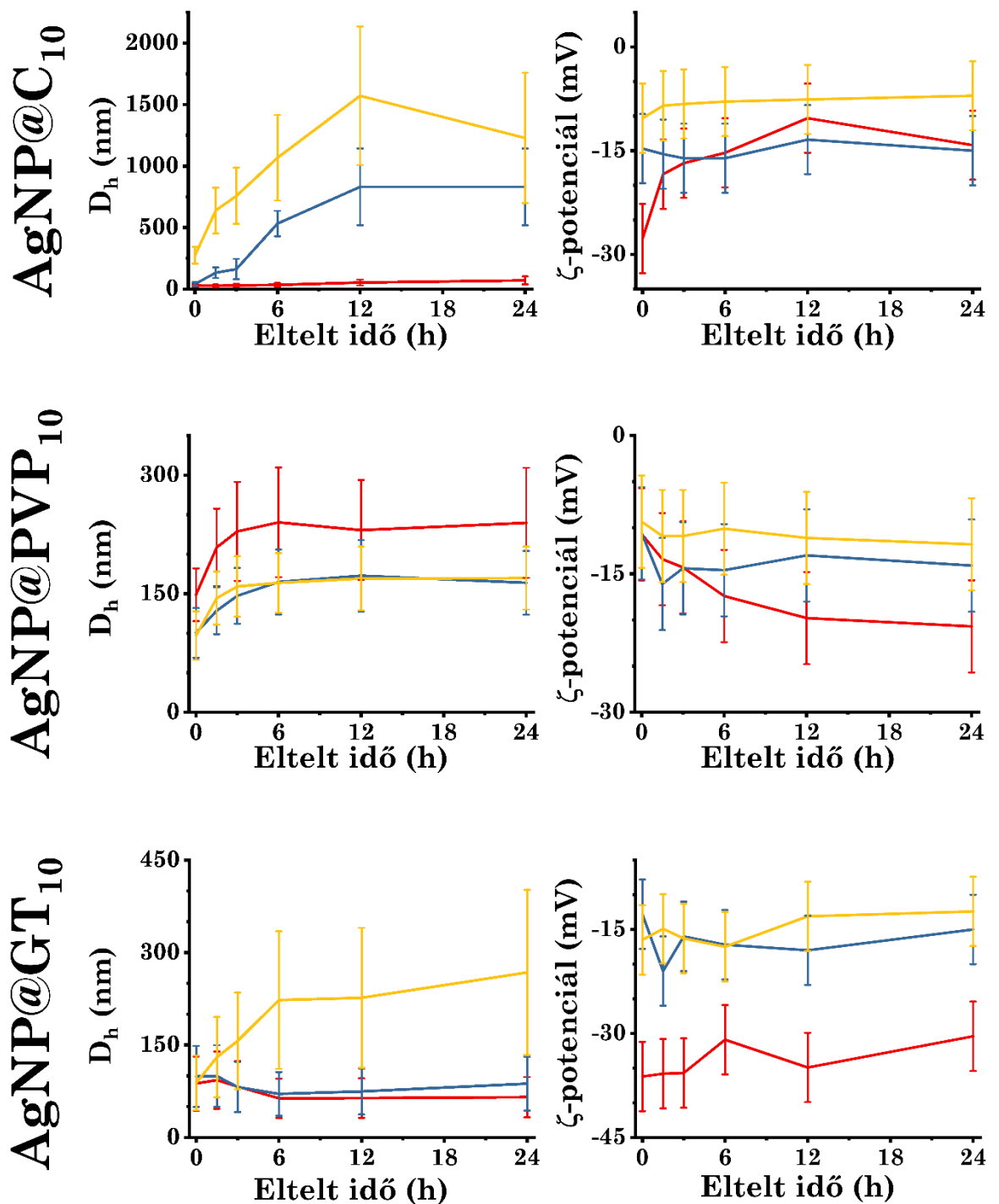
5.2.2.2. Különböző stabilizáció mellett

A citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált ezüst nanorészecskék kolloidstabilitását bemutató D_h és ζ -potenciál eredmények a 21. ábrán láthatók. Elektrosztatikus stabilizációnál (AgNP@C_{10}) az előző fejezetben bemutatott erős aggregáció volt jellemző, a sztérikus AgNP@PVP_{10} minta esetén viszont a nátrium-klorid koncentráció növelése kismértékben még csökkentette is a részecskék átlagos hidrodinamikai átmérőjét, habár a mért ζ -potenciálok enyhén magasabbnak bizonyultak. A D_h értékek csökkenése az elektrosztérikus AgNP@GT_{10} -re már nem volt jellemző, az elektrosztatikus mintához hasonlóan aggregációra utaló tendenciákat tapasztaltuk. A zöld teával stabilizált kolloid esetében azonban a mért aggregátumátmérők akár egy nagyságrenddel is elmaradtak a citrátos mintákban mértektől fiziológiás NaCl koncentrációk esetén, illetve a zéta potenciál eredmények is negatívabb tartományokban maradtak az AgNP@C_{10} -hez képest, a minta erősebb kolloidstabilitását bizonyítva. A sókoncentráció emelése csak a citráttal stabilizált szol esetében eredményezett PDI növekedést (1. melléklet táblázat), míg a másik két minta értékei nem változtak a referencia kísérletekhez képest, ezzel is szemléltetve a sztérikus és elektrosztérikus rendszerek erőteljesebb stabilitását.

Az elektrolit koncentráció emelése a stabilizálószeret vizsgáló mérősorozatban is jelentős SPR változásokat eredményezett mindhárom minta esetében (22. ábra). AgNP@C_{10} esetén az elnyelés intenzitásának csökkenése és vöröseltolódása összhangban volt a minta aggregációjának mértékével (5.2.2.1.-es fejezet). A polimerrel stabilizált AgNP@PVP_{10} kolloid spektrumain szintén jelentős intenzitáscsökkenéseket tapasztaltunk, a részecskék karakterisztikus elnyelése fokozatosan eltűnt a 24 órás időintervallum végére, amit minden esetben erőteljes

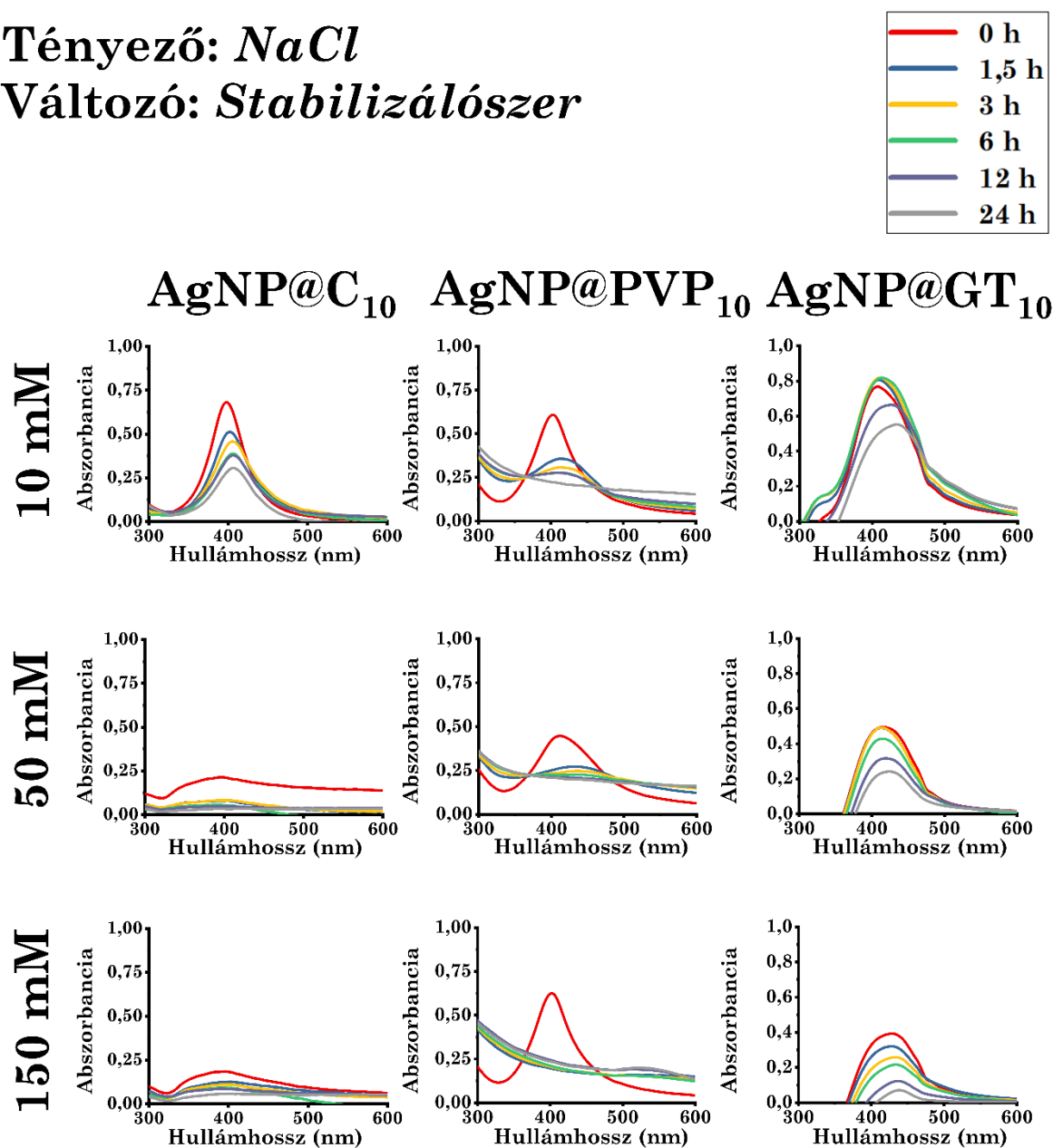
alapvonal emelkedés kísért. Végezetül az AgNP@GT₁₀ kolloid esetén ismét negatív elnyeléseket tapasztaltunk a zöld tea háttér miatt, azonban ebben a mintában a karakterisztikus elnyelési csúcs végig detektálható maradt.

Tényező: *NaCl*
Változó: *Stabilizálószer*



21. ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérőinek és zéta-potenciáljainak változása különböző NaCl koncentrációk mellett, 7,2-es pH értéken

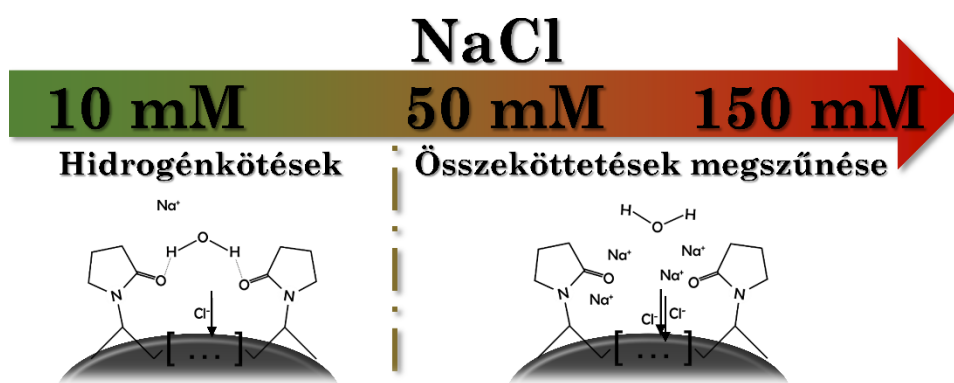
Tényező: *NaCl* Változó: *Stabilizálószer*



22. ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék átlagos UV-Vis spektrumainak változása különböző NaCl koncentrációk mellett, 7,2-es pH értéken

A biológiailag releváns nátrium-klorid koncentrációtartomány mindhárom ezüst szolban sajátos változásokat eredményezett. Az AgNP@C₁₀ részecskék kolloidstabilitása meglehetősen érzékenynek bizonyult a nátrium ionok jelenlétére, amelyek képesek voltak a citrát csoportok negatív töltéseit leárnyékolni, fiziológiás körülmények között már mikronos aggregátumok képződését előidézve. A PVP-vel stabilizált minta esetén a sókoncentráció növekedése az átlagos

aggregátumméret enyhe csökkenését váltotta ki. Ezt a ζ -potenciál emelkedése kísérte, aminek a magyarázata a 23. ábrán látható. A szakirodalom alapján a kolloidon belül közönséges körülmények között lehetőség van arra, hogy vízmolekulák közreműködésével a polimer molekulák pirrolidon csoportjai között H-hidak alakuljanak ki.¹⁸³ A só koncentrációjának növelésével azonban a polimer hídképző, parciális negatív töltésű oxocsoportjai körül a Na^+ ionok mennyisége feldúsulhat, a kapcsolatok megszűnését, illetve a zéta-potenciál emelkedését előidézve. Ezek mellett azonban az UV-Vis alapvonalak emelkedése ismét AgCl csapadék képződésére utalt, ezzel szemléltetve azt, hogy habár fiziológias elektrolit viszonyok között az AgNP@PVP₁₀-es minta kolloidálisan stabil volt, a kémiai stabilitása elmaradt a többi mintához képest.



23. ábra A NaCl koncentráció változásának hatása az ezüst nanorészecskék sztérikus, PVP-vel kialakított stabilizációjára

Végezetül a zöld szintézissel előállított AgNP@GT₁₀ részecskék viselkedését megfigyelve azt tapasztaltuk, hogy a stabilizációhoz használt tea extraktum polielektrolit komponensei mind kolloidálisan, mint kémiaileg meg tudták őrizni a részecskék stabilitását, habár a 150 mM-os NaCl koncentráció ennél a mintánál is mérsékelten megemelte az átlagos hidrodinamikai átmérőt. A megfigyelések alapján a zöld tea elektrosztatikus kölcsönhatásai a komponensek összetettségének ellenére jól modellezhető a citrát csoportok változásai mentén, hiszen a megjelenő tendenciák azonosaknak bizonyultak, továbbá a kísérletek során mért alacsonyabb értékek a PVP-hez hasonló, sztérikus kölcsönhatásoknak révén valósulhattak meg.

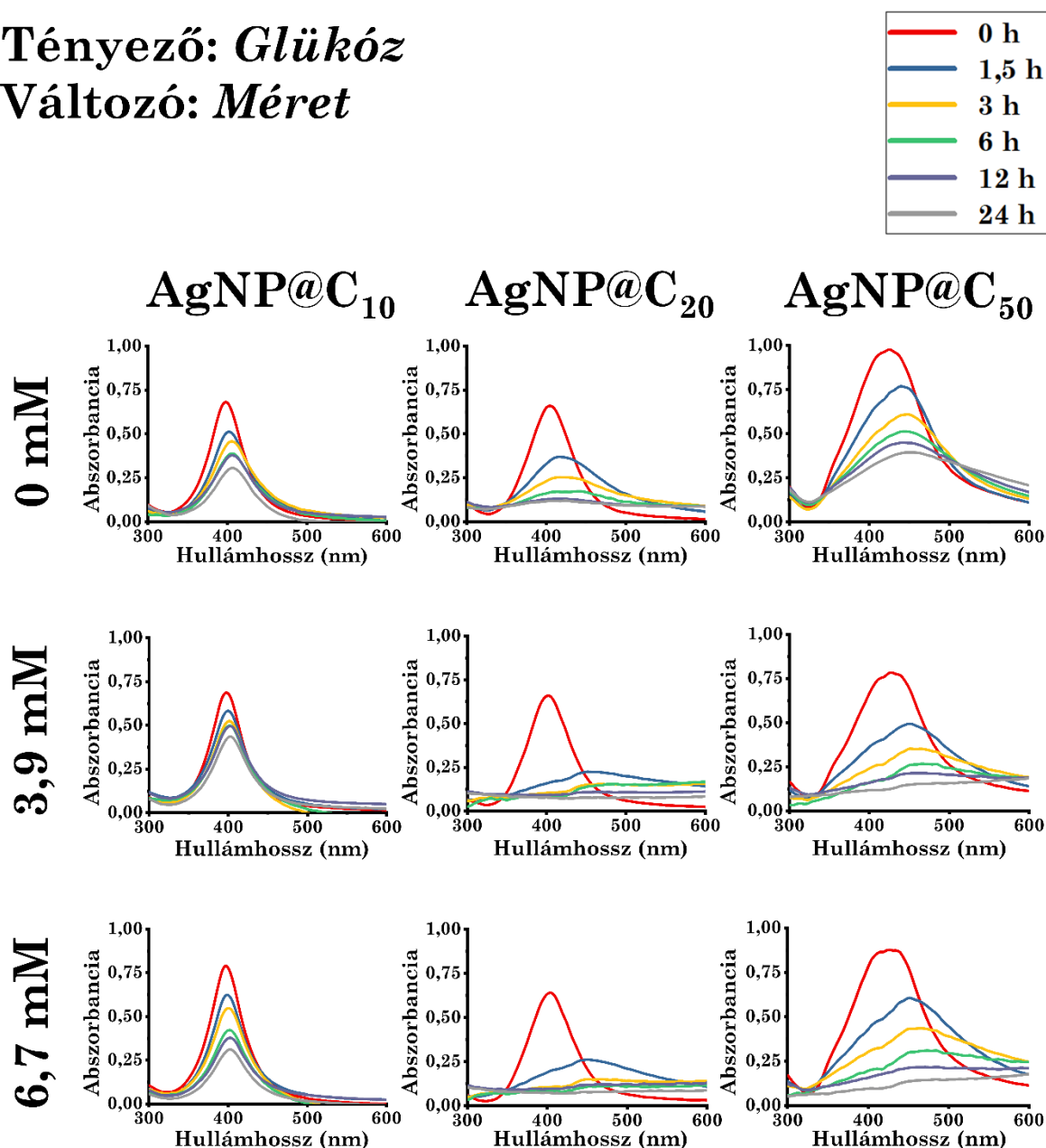
5.2.3. A glükóz és glutamin hatása az ezüst nanorészecske aggregációra

5.2.3.1. Különböző részecskeméretetek mellett

Következő lépésként pár egyszerű, de biológiailag jelentős vegyület jelenlétének hatását vizsgáltuk a különböző méretű AgNP-k kolloidstabilitásának tükrében. Az 1. és 2. melléklet ábra DLS és ζ -potenciál, illetve a 24. és 25. ábra UV-Vis eredményeit összegezve pár általános következtetést vontunk le. A kísérletekhez használt koncentrációkban sem a glükóz, sem a glutamin jelenléte nem idézett elő aggregációt az ezüst nanorészecskék között, mivel az átlagos hidrodinamikai átmérők trendvonalai hibahatáron belül lényegében együtt futottak a referencia mérésekkel. A kísérleteink továbbá arra utaltak, hogy a biomolekulák felületi adszorpciója számottevő volt. A glükóz és glutamin felületi adszorpcióját legjobban alátámasztó eredmények a fényelnyelési spektrumokban látható vöröseltolódások a kontroll mérésekhez viszonyítva, amelyek az aggregáció hiányában felületi jelenségekkel magyarázhatók.^{156,172} Habár ezek a változások a legkisebb, 10 nm-es részecskék esetén még nem eredményeztek látványos eltéréseket, addig a 20 és 50 nanométeres részecskéket tartalmazó kolloidokban már sokkal jobban kifejeződtek, ami a részecskék nagyobb optikai érzékenységevel magyarázható (5.2.1.1.-es fejezet). A glükóz, koncentrációtól függetlenül már 1,5 óra elteltével jól látható vöröseltolódást indukált a nagyobb részecskék esetében, amelynek mértéke megközelítőleg 40 nm volt AgNP@C₂₀ esetében, az AgNP@C₅₀ minta SPR csúcsa pedig 10 nanométert tolódott el a nagyobb hullámhosszak irányába. A glutamin hasonló, de kevésbé jelentős SPR változásokat váltott ki, azonban képes volt a közepes és nagy részecskék zéta-potenciáljainak abszolút értékét enyhén (időponttól függően 5-10 mV-tal) lecsökkenteni. Ez a csökkenés azonban nem befolyásolta a részecskék kolloidstabilitását, ugyanis a kísérletek során alkalmazott 7,2-es pH-n a glutamin ugyan a citrát ionokhoz képest kevésbé, de még mindig negatív töltéssel rendelkezik, mert a rendszert a glutamin izoelektromos pontja felett vizsgáltuk ($pI = 5,65$, $pK_a(\alpha\text{-COOH}) = 2,18$, $pK_a(\alpha\text{-NH}_3^+) = 9,13$).

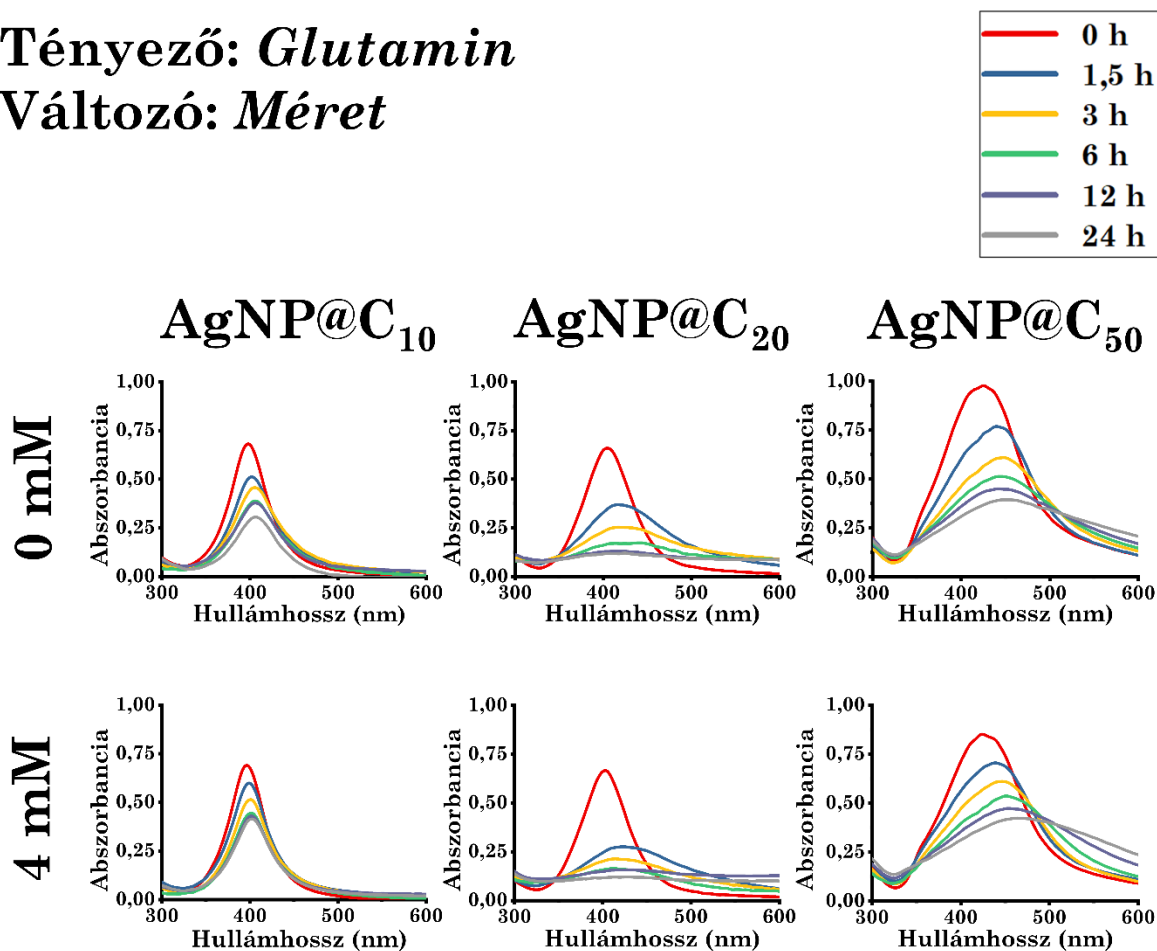
Az eredmények összegzése alapján elmondható, hogy a glükóz és a glutamin képes ráadszorbeálódni az elektrosztatikusan stabilizált ezüst nanorészecskék felületére, jelenlétük azonban nem befolyásolta a citrát csoportokkal stabilizált minták kolloidstabilitását.

Tényező: *Glükóz*
Változó: *Méret*



24. ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék UV-Vis spektrumainak változása különböző glükóz koncentrációk mellett, 7,2-es pH értéken

Tényező: *Glutamin* Változó: *Méret*



25. ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék UV-Vis spektrumainak változása glutamin jelenlétében vagy hiányában, 7,2-es pH értéken

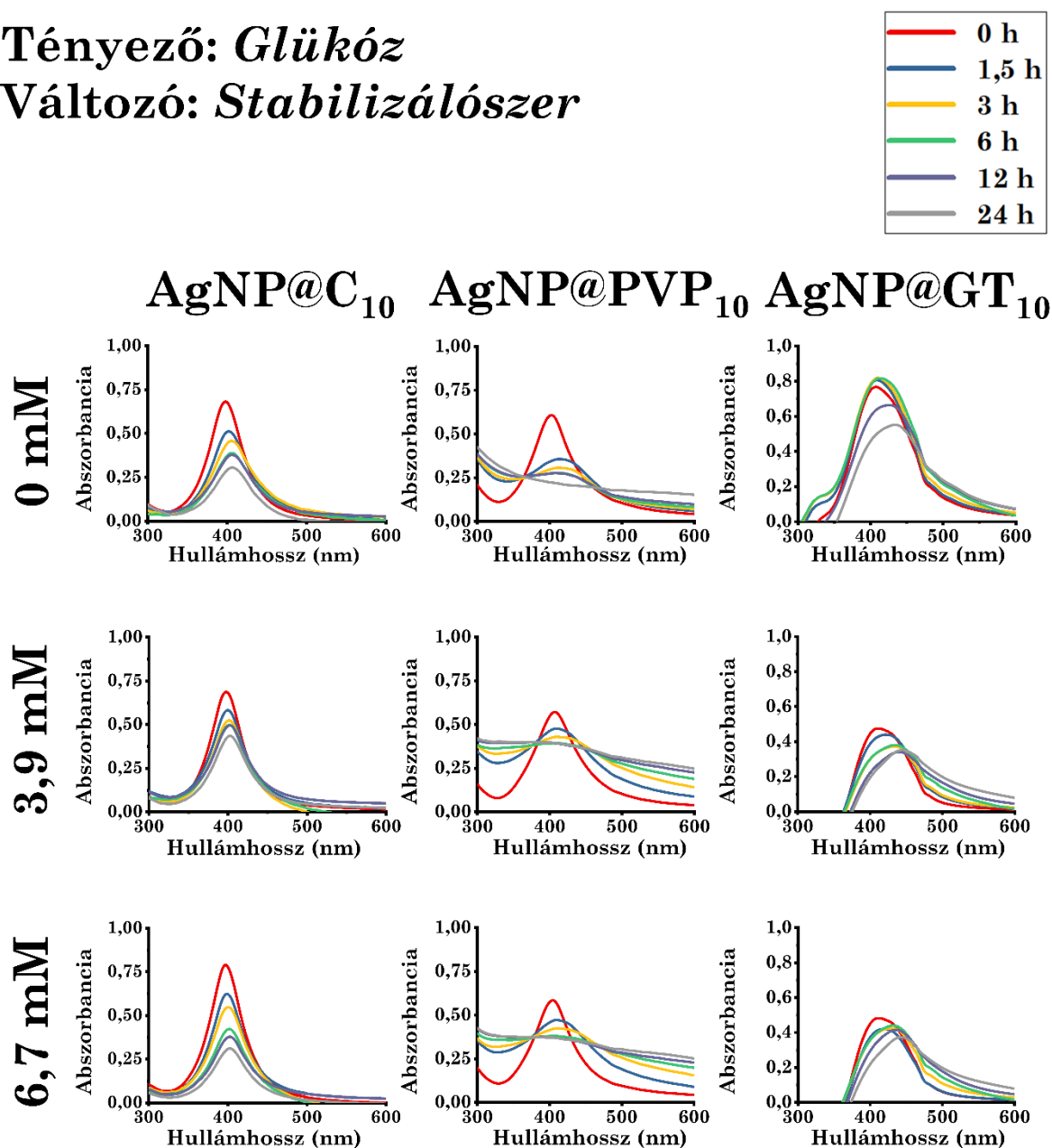
5.2.3.2. Különböző stabilizáció mellett

A glükóz és glutamin hatásának vizsgálatát kiterjesztve a különböző stabilizálószerrel előállított részecskékre, hasonló megfigyeléseket tettünk, mint az előző alfejezet során. Az AgNP@PVP₁₀ D_h és ζ-potenciál eredményeit, valamint a mérések szórását figyelembe véve azt mondhatjuk, hogy a glükóz (3. melléklet ábra) nem befolyásolta számottevően a részecskék kolloid stabilitását, a glutamin (4. melléklet ábra) pedig még enyhén csökkentette is az átlagos aggregátumméretet 7,2-es pH értéken. A minta szempontjából azonban sokkal jelentősebbek az UV-Vis eredmények (26. és 27. ábra) ahol az AgCl megjelenése miatt kialakuló alapvonal emelkedés ellenére hosszabb ideig megmaradtak a karakterisztikus SPR csúcsok és lassabb intenzitáscsökkenést tapasztaltunk, ami arra utalt, hogy a biomolekulák felületi adszorpciója

késleltetni tudta az ezüst nanorészecskék kémiai degradációját. A zöld teás minta eredményeit tekintve szintén felületi adszorpcióra utaló változásokat tapasztaltuk, ahol a legszembetűnőbb eltérést a glutamin hatására történő enyhe aggregátumméret és zéta-potenciál növekedés jelentette (4. melléklet ábra). Ezek a változások arra utaltak, hogy a glutamin a felületi adszorpció során leszoríthatta a zöld tea lazábban kötött elemeit a felületről, hasonlóan a lágy és kemény koronák konverziójának elméletéhez.⁵²

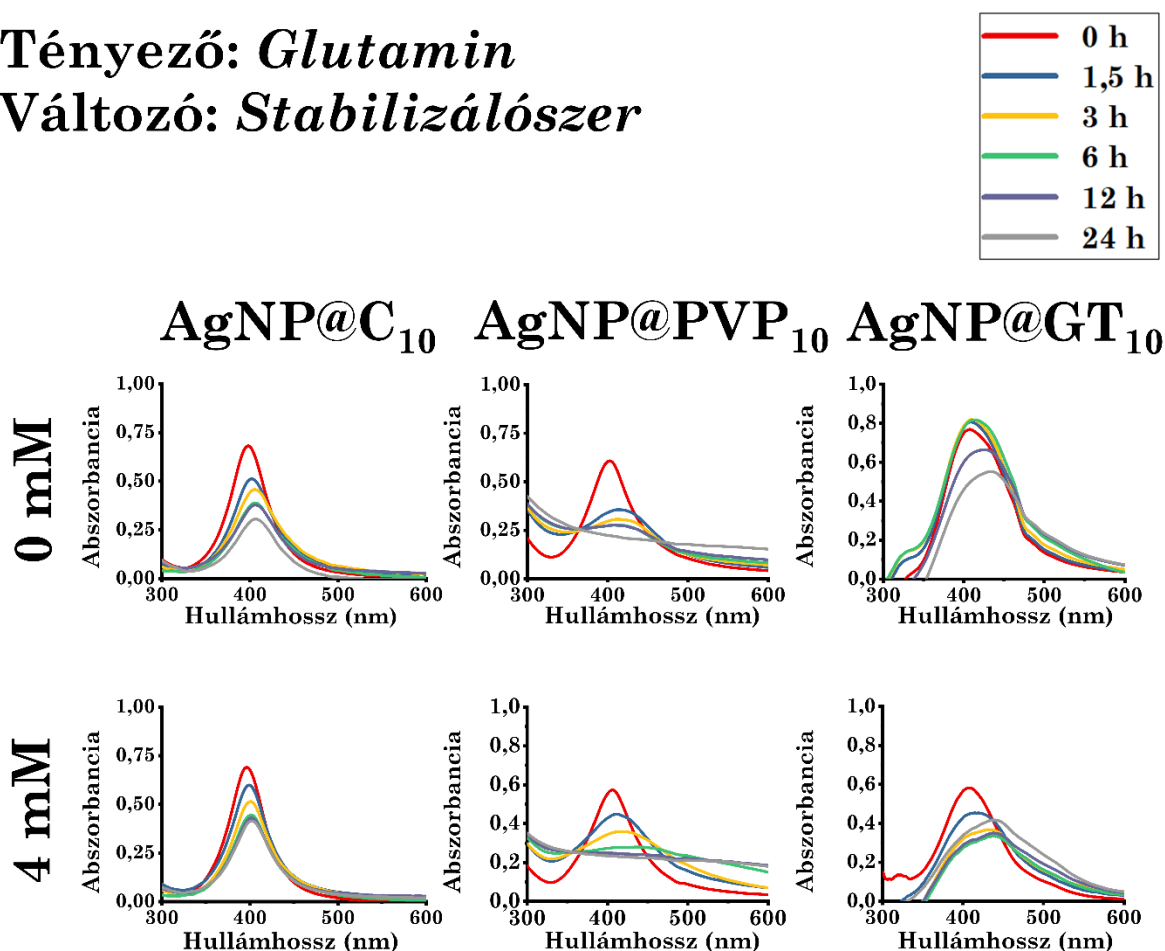
Összegzésként elmondható, hogy a citrát csoportokkal stabilizált koloidhoz hasonlóan (5.2.3.1.-es fejezet), mind a polivinil-pirrolidonos, mind a zöld teás részecskék esetén felületi adszorpcióra utaló változásokat tapasztaltunk. Ez az AgNP@PVP₁₀ esetén a kémiai stabilitás javulását eredményezte, AgNP@GT₁₀ tekintetében pedig annak ellenére, hogy sem a rendszerek kémiai, sem a kolloidális stabilitása nem módosult jelentősen, olyan kicserélődési folyamatokra utaló változásokat tapasztaltunk, amelyek összetettebb esetekben a biomolekuláris koronaképződéshez köthető kölcsönhatásoknak minősülnek.

Tényező: Glükóz
Változó: Stabilizálószer



26. ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék átlagos UV-Vis spektrumainak változása különböző glükóz koncentrációk mellett, 7,2-es pH értéken

Tényező: *Glutamin* Változó: *Stabilizálószer*



27. ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék átlagos UV-Vis spektrumainak változása glutamin jelenlétében és hiányában, 7,2-es pH értéken

5.2.4. Sejtmédium alkotók hatása az ezüst nanorészecske aggregációra

5.2.4.1. Különböző részecskeméretetek mellett

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk az eddigi eredmények relevanciáját életközeli körülmények között, az aggregációs kísérleteket *in vitro* vizsgálatok során használt sejtmédium alkotók jelenlétében is elvégeztük. A sejtes kísérletek egyik legalapvetőbb komponense a kémiai összetétel szempontjából, a lényegében többkomponensű sóoldatként értelmezhető DMEM, amely elsődleges funkciója a szükséges ozmotikus viszonyok fenntartása.¹⁶⁹ A kísérletek során D5030 jelzésű médiumot használtunk, amely nem tartalmaz hozzáadott glutamint, glükózt, HEPES puffert, piroszölősavat, illetve fenol vörös indikátort, így a legalapvetőbb médium komponensek

hatását vizsgálhattuk.¹⁸⁴ A részecskék kolloidstabilitásának szempontjából az FBS egy változatos biomolekulákat (főként fehérjéket) tartalmazó elegy, ezért azt feltételeztük, hogy az eredmények hasonlóságokat mutathatnak majd a glükózt és glutamint felhasználó kísérletek tapasztalataival. A 28. és 29. ábrán látható DLS, ζ -potenciál és UV-Vis eredmények ezen analógiák mentén értelmezhetők.

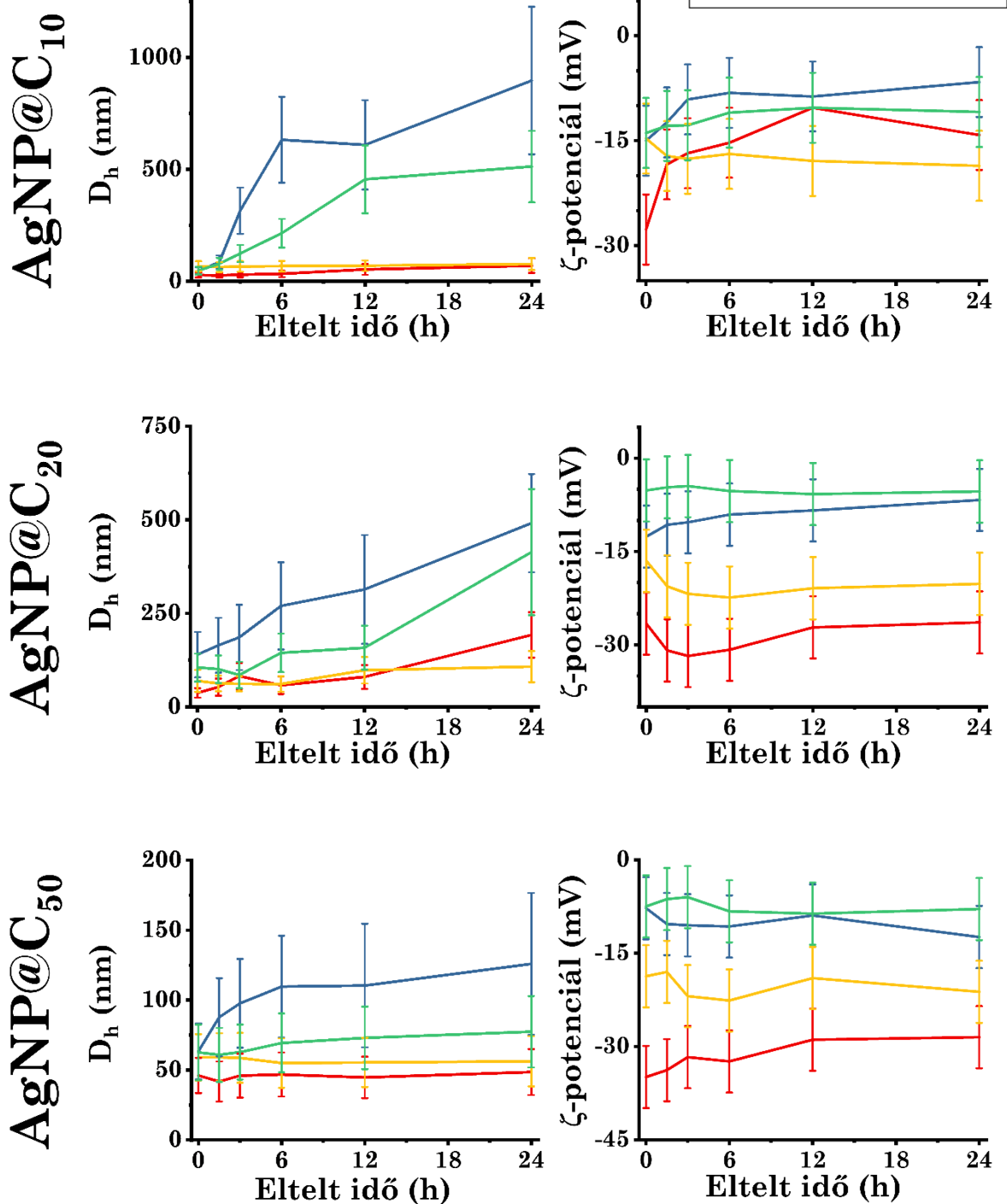
DMEM médiumban szuszpendálva mindhárom AgNP minta hasonló aggregációt mutatott, mint amit megemelkedett NaCl koncentrációk esetén tapasztaltunk; a kolloidstabilitás csökkenése megmutatkozott mind az átlagos hidrodinamikai átmérők növekedésében és a zéta-potenciálok abszolútértékeinek csökkenésében (28. ábra), mind a karakterisztikus UV-Vis csúcsok intenzitásának csökkenésében (29. ábra). A részecskeméret növekedésének hatása a médium esetén is megfigyelhető volt; 24 óra elteltével az átlagos hidrodinamikai átmérő értékek fordított arányosságot mutattak a primer részecskemérettel. A kis, és közepes részecskék esetén DMEM által generált aggregátumok méretei az 50 és 150 mM-os NaCl trendek közé estek (5.2.2.1.-es fejezet), míg a legnagyobb részecskénél a DMEM által generált aggregátumok már kisebbek voltak, mint az 50 mM-os NaCl jelenlétében végzett kísérlet esetén. Ezek a megfigyelések abból következtek, hogy az 50 v/v%-os DMEM ionerőssége nagyjából 65 mM-nak felel meg, illetve a DMEM-ben egyéb kismolekulák is találhatók, amelyek felületi adszorpciója kismértékben növelni tudta a részecskék kolloidstabilitását, amely az eleve erősebb stabilitást mutató AgNP@C₅₀ esetében tudott a legjobban kifejeződni.^{169,185,186}

Az FBS hasonló változásokat indukált, mint a glükóz és a glutamin. A fehérjék és egyéb biomolekulák jelenléte nem befolyásolta a kolloidok átlagos hidrodinamikai átmérőjét, ugyanakkor a felületi adszorpció jelei a zéta és SPR mérések során tapasztalható volt. A kialakuló felületi adszorpció mindhárom minta zéta-potenciálját -20 mV körüli értékre módosította, és habár a felületi adszorpciókor klasszikusan jelentkező vöröseltolódás nem volt jelentős (ami az adszorptívum anyagi minőségétől is függ), a kontroll vizsgálatokhoz képest az UV-Vis spektrumok intenzitásainak csökkenése késleltetett volt, arra utalva, hogy a részecskék tovább maradnak szabadon diszpergálva a folyadékközegben. A megfigyelések arra engedtek következtetni, hogy az FBS komponensei biomolekuláris koronát alakítottak ki a részecskék körül. Ezt az elképzelést a médiumot és szérumot egyaránt tartalmazó DMEM+FBS mérésorozat támasztotta alá megkérdőjelezhetetlenül.

A kétkomponensű közegben végzett kísérletek során a lecsökkent abszolútértékű zéta-potenciálok ellenére alacsonyabb aggregátumméreteket detektáltunk, valamint a stabil részecskékre jellemző SPR elnyelési csúcsok is intenzívebbek maradtak az idő előrehaladtával, mint a DMEM-es kísérletek során, tehát a kialakuló biomolekuláris koronák olyan elektrosztérikus kölcsönhatásokat alakítottak ki a részecskék körül, amely csökkenteni tudta a részecskék aggregációra való hajlamát fiziológias sókoncentrációjú közegben. Az előző fejezetek során tapasztalt, primer részecskeméret emelkedésével járó erősebb kolloidstabilitás ebben a kísérletsorozatban is megfigyelhető volt, a nagyobb méret és biomolekuláris koronaképződés együttes hatása pedig abban összpontosult, hogy az 50 nanométeres, FBS koronával körülvett részecskék nem mutattak számottevő aggregációt még 24 óra elteltével sem.

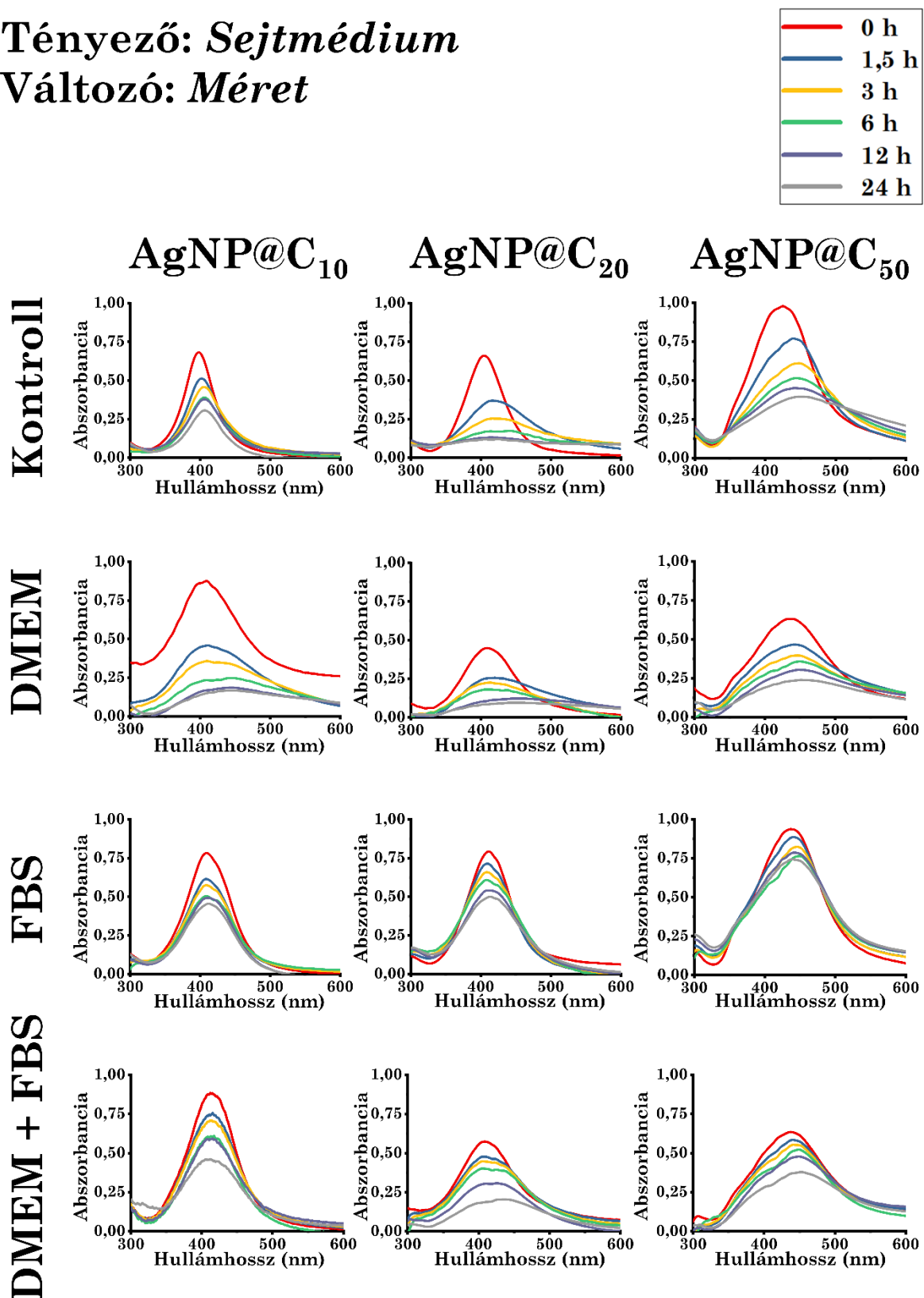
Összegzésként azt mondhatjuk, hogy az *in vitro* sejtmédium komponensek hasonló módon befolyásolták a citrát csoportokkal stabilizált részecskék aggregációját, mint az előző fejezetekben vizsgált egyszerűbb, de kémiai szempontból hasonló rendszerek. Az eredmények értelmében az ezüst nanorészecskék bioreleváns kolloidstabilitásának szempontjából talán a legmeghatározóbb folyamat a közeg biomolekuláinak adszorpciója, hiszen a kialakuló koronák biológiai funkcióikon túl, a részecskék aggregációval szembeni védelmét is biztosíthatják.^{176,186}

Tényező: *Sejtmédium*
Változó: *Méret*



28. ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérőinek és zéta-potenciáljainak változása sejtmédium alkotók jelenlétében

Tényező: *Sejtmédium*
Változó: *Méret*



29. ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék UV-Vis spektrumainak változása sejtmédium alkotók jelenlétében

5.2.4.2. Különböző stabilizáció mellett

A sejtmédium alkotók ezüst nanorészecskékre gyakorolt hatása különböző stabilizálószerke mellett is érvényesült. Az előző alfejezetben leírtak szerint az AgNP@C₁₀ nevű kolloid esetén erős aggregációt figyeltünk meg a DMEM magas sókoncentrációjának hatására, ezzel szemben az FBS biomolekulái koronát képezve javítani tudták a részecskék kolloidstabilitását az *in vitro* kísérleteknél használt elektrolitkoncentráció mellett.

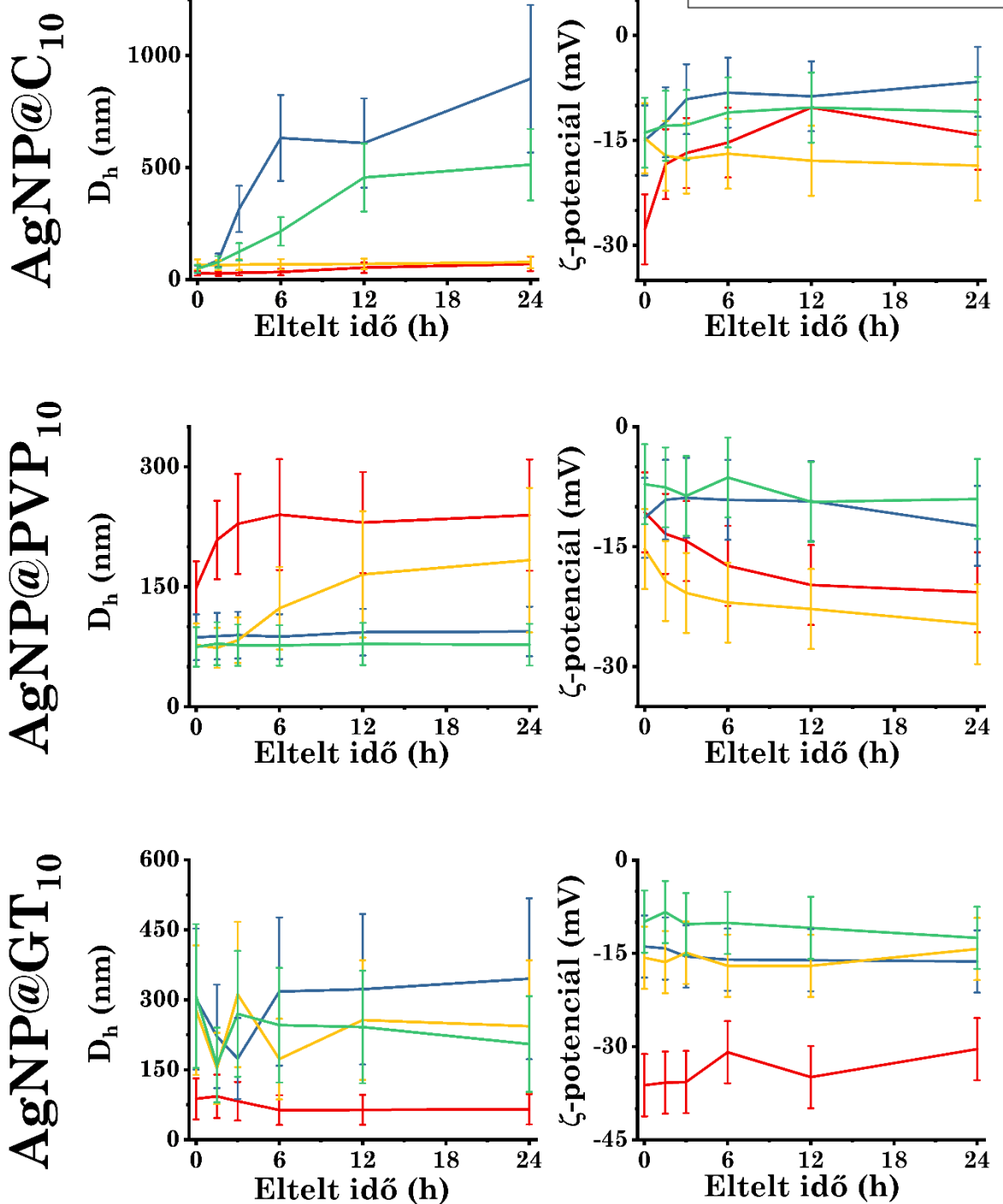
A sztérikusan stabilizált AgNP@PVP₁₀ esetén a nátrium-kloridot vizsgáló kísérletekhez hasonlóan ezúttal sem tapasztaltunk aggregációt az elektrolitkoncentráció megnövelése kapcsán. Épp ellenkezőleg, a minta átlagos hidrodinamikai átmérője (30. ábra) a 0 órás mérések szerint DMEM jelenlétében a felére csökkent, amelyet a 24 órás kísérlet alatt meg is tartott a kontroll mérésekkel ellentétben, ahol kationok hiányában a már említett „víz hidak” könnyen kialakulhattak. FBS-t tartalmazó közegben egy enyhe emelkedő tendenciát mutató, de a referenciához képest végig alacsonyabb D_h értékeket felvevő trendet kaptunk, és a citrátos mintáknál FBS jelenlétében megfigyelt -20 mV körüli zéta-potenciál eredmények (Az UV-Vis eredményekkel együtt értelmezve) korona kialakulására utaltak. Mivel a PVP-vel stabilizált minta kolloidstabilitását külön egyik komponens sem befolyásolta számottevően, ezért a vártak megfelelően a kevert, DMEM+FBS közeg sem eredményezett aggregációt. Az eddigi mérések alapján az AgNP@PVP₁₀ nagy kolloidstabilitásának ellenére, a részecskék kémiai szempontból nem bizonyultak túl ellenállónak. A 31. ábra középső oszlopának UV-Vis eredményei tükrében azonban sok új információt nyertünk a részecskék degradációjának mechanizmusáról. A tiszta DMEM-ben mért SPR spektrumok bebizonyították, hogy az előző mérések során tapasztalt alapvonal emelkedés kétséget kizáróan AgCl képződésnek tudható be, ugyanis a médium összetett környezetében, amelyben a hasonló ionerősség kevesebb kloridion felhasználásával történik, az eddig tapasztalt változások nem jelentek meg. Az 5% FBS-t tartalmazó kísérlet, ahol a háttér elektrolit továbbra is NaCl volt, bepillantást engedett a biomolekuláris koronák egy további tulajdonságába, ahol az alapvonal emelkedés helyett egy közeli UV-ban nagyon intenzíven elnyelő csúcsot figyelhettünk meg már a kísérlet kezdeti időpontjában is. A szakirodalom alapján ennek a csúcsnak a megjelenése nanométer alatti ezüst, vagy ezüst-klorid klaszterek megjelenésének tudható be, arra utalva, hogy a kémiai degradáció alkalmával a részecskék bizonyos mértékig fragmentálódnak is.^{187,188} Ezek a klaszterek valószínűsíthetően az előző kísérletek során is kialakultak, azonban rögtön tömbfázisú csapadékká alakultak, nagy felületi energiájuknak

köszönhetően. Az FBS azonban a nanorészecskékhez hasonlóan a klaszterek körül is ki tudott alakítani védőréteget, megőrizve a karakterisztikus elnyelésüket. A megfigyelések alapján tehát a biomolekuláris koronák nem pusztán a nanorészecskék kolloidstabilitását módosítják, hanem akár a kémiai stabilitásukat is képesek befolyásolni.

A zöld tea extraktummal készített nanoezüst minta DMEM és FBS jelenlétében is hidrodinamikai átmérő és zéta-potenciál növekedést mutatott. Mivel az AgNP@GT₁₀ részecskék viselkedése NaCl környezetben a citrátos részecskék logikáját követték, így a médium jelenlétében bekövetkezett aggregáció is megmagyarázható a médium ionjainak töltésléarnyékoló hatásával, habár a polielektrolit mátrix sztérikus kölcsönhatásainak köszönhetően alacsonyabb számértékeket mértünk. A szérum jelenléte nem várt módon szintén enyhe aggregációra utaló DLS és ζ értékeket eredményezett, habár az idő előrehaladtával az aggregátumméret enyhe csökkenő tendenciát mutatott a DMEM-es kísérlettel ellentétben. Az FBS által előidézett változások a glutaminnal analóg módon értelmezhetők, ahol az új biomolekulák megjelenésével a korona összetételének átrendeződését tapasztaltuk, amit alátámaszt az is, hogy SPR elnyelési csúcsok (31. ábra) fennmaradtak a D_h növekedése ellenére is, jelezve az elkülönült részecskék jelenlétét.

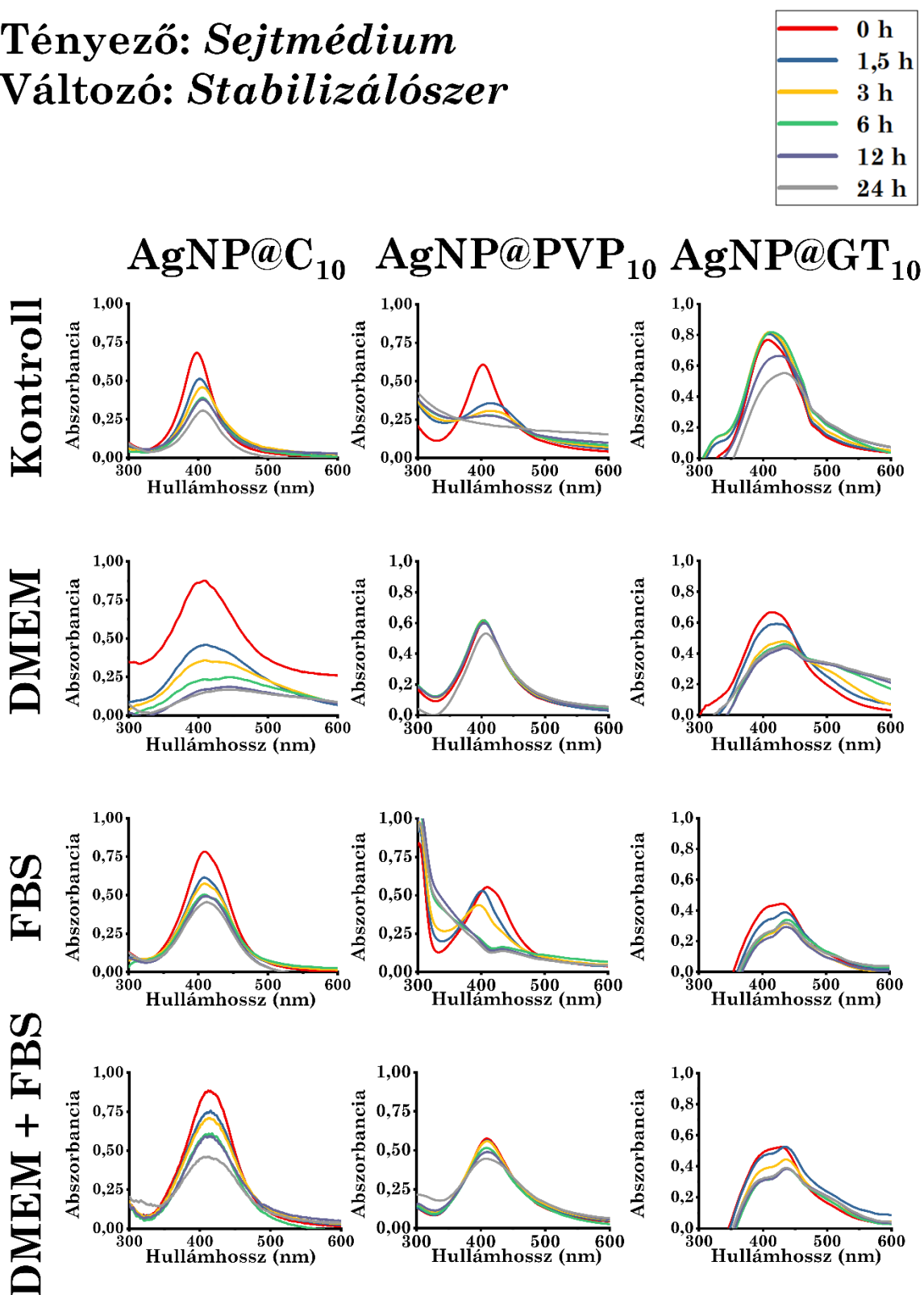
Összességében az a következtetés vonható le, hogy a zöld teás minta szerepelt a legjobban az ezüst szolok közül, hiszen kolloidális és kémiai szempontokból is ellenállt az *in vitro* komponensek jelenlétének. A másik két minta ezzel szemben valamilyen tekintetben elmaradt az elektrosztérikusan stabilizált részecskéktől: a citráttal stabilizált minták kolloidstabilitása volt gyenge, ameddig a PVP-vel borított részecskék kémiai degradációja jelenthet kockázatot.

Tényező: *Sejtmédium*
Változó: *Stabilizálószer*



30. ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérőinek és zéta-potenciáljainak változása sejtmédium alkotók jelenlétében

Tényező: Sejtmédium
Változó: Stabilizálószer



31. ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék UV-Vis spektrumainak változása sejtmédium alkotók jelenlétében

A kutatómunka utolsó lépésében elvégzett *in vitro* vizsgálatok megtervezése érdekében az aggregációs vizsgálatok főbb meglátásait összefoglaltuk. A savas kémhatás és az emelkedett nátrium-klorid koncentráció hasonló változásokat idézett elő az összes mintában: az alacsony kolloidstabilitású minták esetén aggregációt tapasztaltunk, a kémiai instabil AgNP@PVP₁₀ esetén pedig ezüst-klorid kiválást figyeltünk meg. A biomolekulák jelenléte a kolloid rendszerekben koronaképződést idézett elő felületi adszorpció révén, amely megfelelő koncentráció és összetettség felett képes volt a részecskék kolloid-, és kémiai stabilitását is javítani. A stabilitásromlás jellemzéséhez olyan feltételeket kellett választanunk, amelyek a részecskék számára kedvezőtlenek, viszont nem toxikusak a tenyésztett sejtek számára. Mivel a kémhatás változása a sejtek szempontjából is kedvezőtlen lehet, ezért úgy döntöttünk, hogy a részecskék stabilitását a sejtes vizsgálatok során 150 mM NaCl segítségével fogjuk csökkenteni.

5.3. *In vitro* vizsgálatok

A sejtbiológiai vizsgálatok első lépéseként meghatároztuk humán sejteken és mikrobákon a különböző ezüst nanorészecskék IC₅₀ és MIC koncentrációit, amelyeket a mellékletek 2. és 3. táblázatában összegeztünk.^{170,176} Az értékekről általánosságban elmondható, hogy a szakirodalomban többször leírt méretfüggő toxicitás megfigyelhető volt, a kisebb részecskék többnyire már alacsonyabb koncentrációban jelentős viabilitás csökkenést tudtak előidézni.^{5,6,39,170} Az aggregációfüggő toxicitás kísérletek során ezeket az AgNP koncentrációkat alkalmaztuk a sejteken, miután az adott ezüst kolloidot meghatározott ideig nátrium-kloriddal inkubáltuk az aggregálódás érdekében.

5.3.1. Aggregáció függő citotoxicitás vizsgálatok

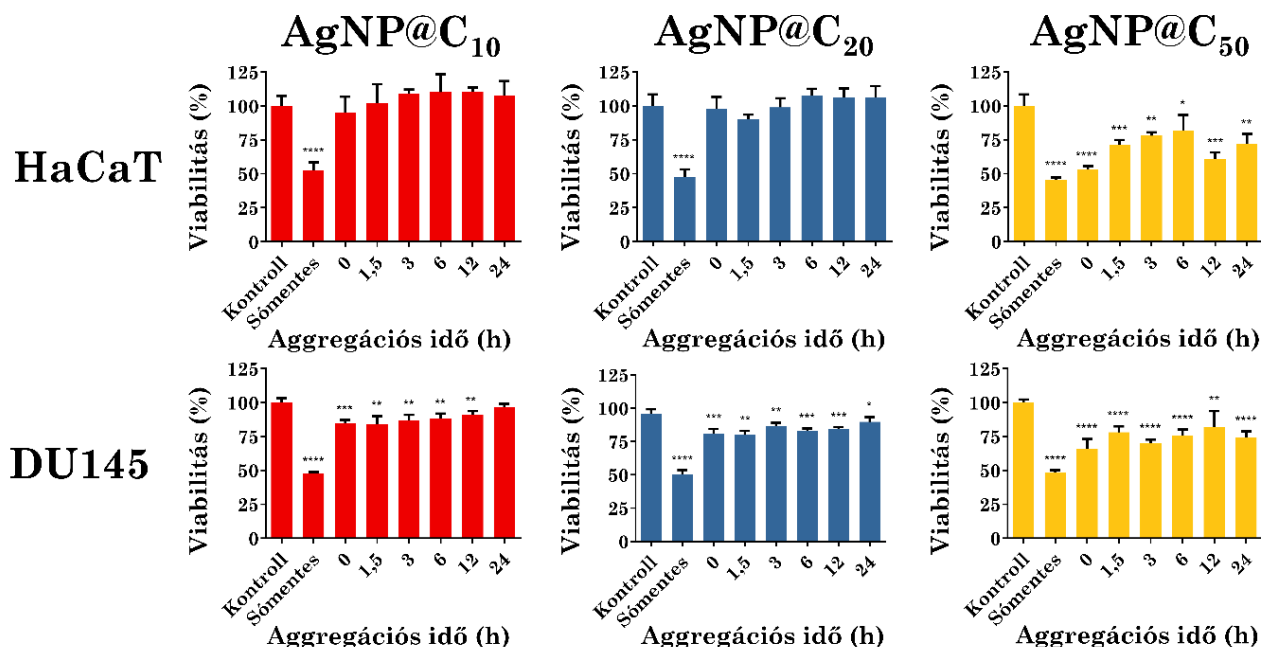
5.3.1.1. Különböző részecskeméretek mellett

A 32. ábrán látható diagramok első oszlopai a kezeletlen kontrollcsoport 100 %-nak tekintett viabilitását ábrázolják, a második oszlopok előzetesen nem aggregáltatott, IC₅₀ koncentrációban alkalmazott referenciákat jelölnek, a későbbi oszlopok pedig az előzetes aggregációs vizsgálatokkal összhangban lévő, adott ideig nátrium-kloriddal kezelt részecskediszperziókat szemléltetik.

A citráttal stabilizált ezüst nanorészecskék aggregációja a részecskék méretétől függetlenül a toxicitás csökkenését eredményezte. A tapasztalt tendenciák a sejtvonalaktól függetlenül megfigyelhetők voltak, a primer részecskeméret azonban újfent jelentős különbségeket

eredményezett. A legkisebb, 10 nm-es részecskék erőteljes aggregációjának eredményeként a részecskék azonnal elveszítették HaCaT sejtekre kifejtett toxikus hatásukat. DU145 sejteknél 12 órán keresztül ugyan megfigyelhettünk enyhe aktivitást (~90 %-os viabilitási értékek), a 24 órás mérési pontban már azonban nem mutatkozott statisztikailag szignifikáns eltérés a kezeletlen kontrollcsoporthoz képest. A közepes méretű részecskék hasonló viselkedést mutattak, mint az AgNP@C₁₀, azonban DU145 esetén ennél a mintánál gyenge (~10 %-os), de 0,05-ös szignifikancia szinten még statisztikailag jelentős toxicitást tapasztaltunk. Az előző két kolloiddal ellentétben, a legnagyobb átmérővel rendelkező részecskék diszperziója mindkét sejtvonal esetén hosszantartó toxicitást mutatott és ennél a mintánál tapasztaltuk a legkisebb, nagyjából 25%-os viabilitás emelkedést a kiindulási 50%-os szinthez képest.

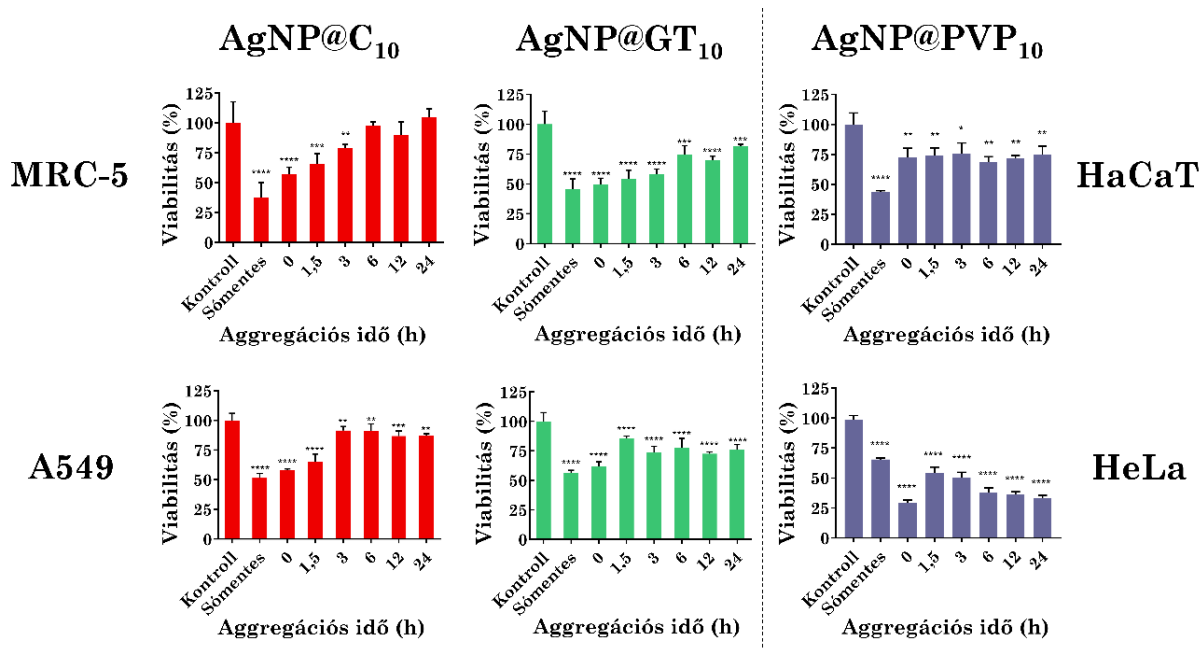
A citrát csoportokkal stabilizált nanoezüst kolloidok 5.2.-es fejezetben tapasztalt viselkedése a részecskék biológiai aktivitásában is megmutatkozott, bizonyítva a feltételezésünket, hogy a részecskeaggregációnak közvetlenül mérhető és erőteljes hatása van a citotoxicitásra. A primer részecskeátmérő növelésével emelkedő kolloidstabilitás pedig demonstrálta, hogy a hosszantartó aktivitás szemszögéből nem feltétlenül előnyös a lehető legkisebb nanorészecskék alkalmazása.



32. ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék toxicitásának változása 150 mM NaCl hatására nem tumoros (HaCaT) és tumoros (DU145) sejtvonalakon 24 órás inkubációs idő elteltével

5.3.1.2. Különböző stabilizáció mellett

A különböző stabilizálószer jelenlétében szintetizált ezüst nanorészecskék citotoxicitását a 33. ábra mutatja be nem tumoros (felső sor) és tumoros (alsó sor) sejteken. A kutatás időkeretei miatt ebben a kísérlet sorozatban a sejtvonalak egységes használata sajnos nem tudott megvalósulni, AgNP@PVP₁₀ esetén eltérő sejtekkel kellett dolgoznunk (habár az AgNP@C₁₀ és HaCaT sejtek viszonya a 32. ábrán megtalálható). A citrátos minta az 5.3.1.1.-es alfejezetben leírtakhoz hasonlóan MRC-5 és A549 sejteknél is erős toxicitáscsökkenést tanúsított az aggregáció idejével arányosan, azonban ameddig az egészséges tüdő fibroblaszt sejtek esetében a részecskék toxicitása 6 óra elteltével megszűnt, a tumoros A549-nél enyhén fennmaradt a nanoezüst biológiai aktivitása (~90 %-os viabilitás). A megfigyelés alapján elmondhatjuk, hogy habár a részecskeaggregáció mélyrehatóan befolyásolhatja az ezüst nanorészecskék biológiai hatásait, nem feledkezhetünk meg az élő rendszerek egyéni adottságairól, amelyek egy adott sejtvonalat ellenállóbbá, vagy éppen érzékenyebbé tehetnek bizonyos anyagokkal szemben.



33. ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék toxicitásának változása 150 mM NaCl hatására nem tumoros (MRC-5, HaCaT) és tumoros (A549, HeLa) sejtvonalakon 24 órás inkubációs idő elteltével

A sztérikusan stabilizált, de az 5.2.-es fejezet alapján kémiai szempontból érzékeny AgNP@PVP₁₀ részecskék toxicitása sejtvonaltól függetlenül jelentős maradt, HeLa sejtek esetén

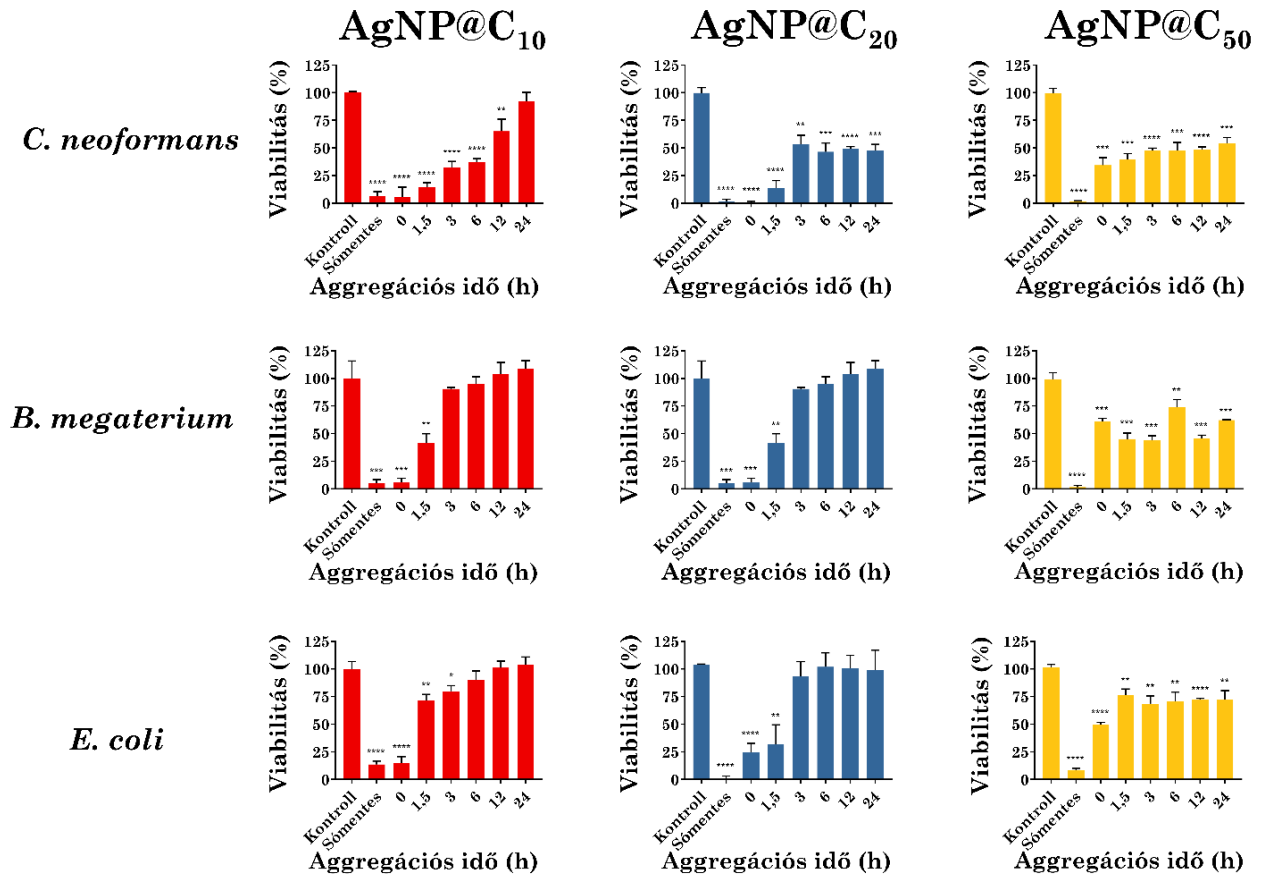
még enyhe toxicitás emelkedést is tapasztaltunk. A jelenség egyfelől magyarázható a kolloidstabilitás fennmaradásával ezekben a rendszerekben, illetve azzal, hogy a HaCaT és HeLa sejtvonalak AgCl-re mutatott IC₅₀ értékei nagyon közeliak voltak az elemi nanorészecskék koncentrációival a kiegészítő méréseink alapján (HaCaT: IC₅₀(AgNP@PVP) = 2,74 ppm; IC₅₀(AgCl) = 2,34 ppm; HeLa: IC₅₀(AgNP@PVP) = 15,22 ppm; IC₅₀(AgCl) = 10,37 ppm). Habár ez a viselkedés tisztán a toxicitás szempontjából előnyösnek tűnhet, az AgCl megjelenése számos esetben beláthatatlan mellékreakciókat idézhet elő, például megemlíthetünk intravénás alkalmazásokat, ahol az erekben meginduló csapadékképződés komoly következményekkel járhat.

A zöld tea extraktummal elektrosztérikusan stabilizált ezüst nanorészecskék toxicitásának változása a 150 mM-os sókoncentráció hatására mérsékelt emelkedést mutatott. Egy nap elteltével mindkét sejtvonal esetében 80 % körüli viabilitási értékeket figyeltünk meg, amely ugyan alacsonyabbnak bizonyult, mint amit az AgNP@PVP₁₀ kolloid esetén figyeltünk meg, azonban, mivel ennél a szolnál nem figyeltünk meg csapadékképződésre utaló jeleket, és az elektrosztatikus AgNP@C₁₀ mintával ellentétben a részecskék toxicitása is fennmaradt, a részecskék biológiai felhasználásainak szempontjából az elektrosztérikus stabilitás bizonyult a legkedvezőbbnek.

5.3.2. Aggregáció függő antimikrobiális vizsgálatok

5.3.2.1. Különböző részecskeméreték mellett

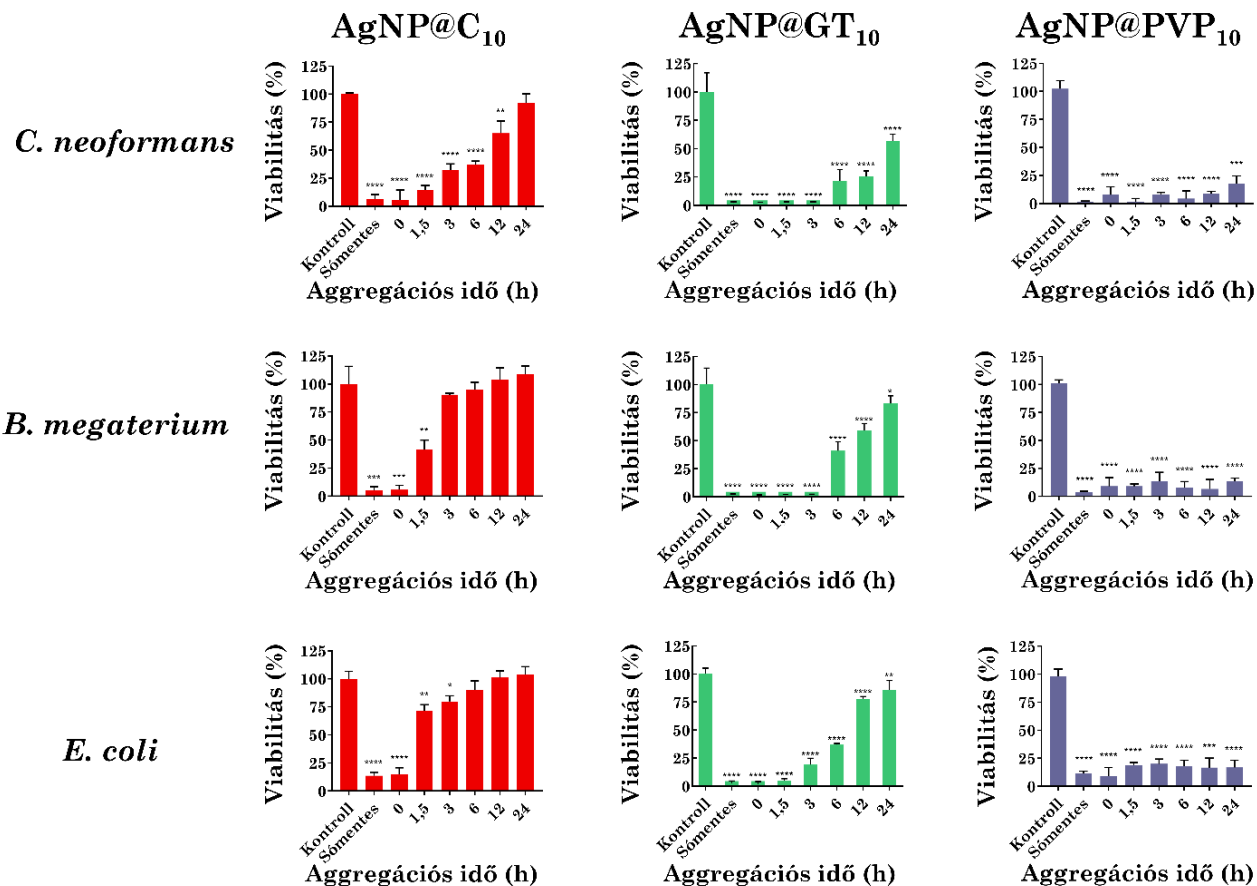
A három különböző méretű AgNP@C kolloid aggregációfüggő antimikrobiális hatását a 34. ábra mutatja be. A mikrodilúciós kísérletek eredményei azonos következtetésekhez vezettek, mint az MTT esszék: a 10 nm-es részecskék minden törzs esetén elvesztették az aktivitásukat a 24 órás kísérlet végére, a 20 nm-es részecskék *C. neoformans* esetében toxikusak maradtak, ameddig a baktériumok esetében az aggregáció teljes aktivitásvesztéshez vezetett, végezetül az 50 nm-es AgNP-k mindhárom esetben toxikusak maradtak. Az aktivitáscsökkenés időbeli változásának erélyessége alapján azt mondhatjuk, hogy kolloidstabilitástól függetlenül a *C. neoformans* gombatörzs érzékenyebb volt a nanoezüst jelenlétére, mint a vizsgált baktériumtörzsek, ami egyéb kutatásaink alapján például azzal magyarázható, hogy bizonyos biofilmképző gombák esetén, (mint amilyen a *C. neoformans* is) a nanorészecskék nem csak a direkt toxicitásuk révén fejthetik ki a hatásukat, hanem a kialakuló biofilm struktúráját is képesek roncsolni, ezzel gyengítve az ellenállóképességüket a külső hatásokkal szemben.¹⁸⁹



34. ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék toxicitásának változása 150 mM NaCl hatására gomba (*C. neoformans*), Gram-pozitív (*B. megaterium*) és Gram-negatív (*E. coli*) mikroba törzseken 24 órás inkubációs idő elteltével

5.3.2.2. Különböző stabilizáció mellett

A kutatómunka utolsó kísérletsorozata során a különböző stabilizációval rendelkező AgNP minták antimikrobiális hatásának vizsgálata következett, amit a 35. ábra szemléltet. A citrát csoportokkal stabilizált, könnyen aggregálódó részecskékkal ellentétben mind az AgNP@PVP₁₀, mind az AgNP@GT₁₀ minták megőrizték toxicitásukat a kísérlet teljes időtartama alatt. A legerősebb toxicitást a sztérikusan stabilizált minta demonstrálta, habár az 5.3.1.2.-es alfejezetben említett megfontolások miatt ez az erős toxicitás nem feltétlenül használható valós alkalmazások keretein belül a csapadékképződés miatt. Végző soron a zöld teás nanoezüst kolloid toxicitása a citrátos mintához hasonlóan fokozatosan csökkent az aggregációs idő előrehaladtával, szemléltetve az aggregáció hatását. A részecskék biológiai aktivitása ennél a sorozatnál is minden esetben megmaradt, azonban a baktériumok esetében 24 órás aggregációs idő elteltével már csak a toxicitás 15-20 %-a tapasztalható, ami a baktériumok ellenállóképességére utalt.



35. ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék toxicitásának változása 150 mM NaCl hatására gomba (*C. neoformans*), Gram-pozitív (*B. megaterium*) és Gram-negatív (*E. coli*) mikroba törzseken 24 órás inkubációs idő elteltével

Az MTT sejtvitalitási, és antimikrobiális esszéink összhangot mutattak a kolloidstabilitási vizsgálatainkkal, valamint rávilágítottak a részecskeaggregáció és a toxicitás szoros kapcsolatára. Az eredményeink alapján a biológiai aktivitás megőrzéséhez két módon juthatunk el: a primer részecskeátmérő növelése révén, vagy olyan erős kölcsönhatások kialakításával, amelyek mind a kolloid-, mint a kémiai stabilitást biztosítani képesek.

6. ÖSSZEFOGLALÁS









































Kiváló biológiai aktivitásuknak köszönhetően, az ezüst nanorészecskék az egyik legnagyobb jelentőséggel bíró szervesetlen nanoszerkezetek az orvosbiológiai alkalmazások szempontjából. A területet érintő kutatások során azonban a részecskék aggregációjának kérdése rendszerint háttérbe szorul, annak ellenére, hogy a különböző biológiai rendszerek nem ideálisak a nanorészecskék kolloidstabilitásának szempontjából, ráadásul ezt a tulajdonságot olyan paraméterek is jelentősen befolyásolják, amelyek a bio-nano kutatásokban is nagy relevanciával rendelkeznek, mint például a részecskék mérete és a felületi stabilizálószer minősége és mennyisége.







A kutatómunka célja különböző méretű és stabilizáló mechanizmussal rendelkező ezüst nanorészecskék szintézise, továbbá ezen paraméterek hatásának vizsgálata volt a részecskék bioreleváns kolloidstabilitására. Ezeken felül a részecskeaggregáció közvetlen *in vitro* biológiai hatását is meg szeretnénk volna határozni humán sejteken és mikrobákon egyaránt.

A kísérletek első szakaszában sikeresen előállítottunk három különböző, megközelítőleg 10 nm átmérőjű AgNP kolloid rendszert, amelyek felületén eltérő stabilizáló mechanizmust alakítottunk ki: az AgNP@C₁₀ minta citrát csoportjai elektrosztatikus taszítást, az AgNP@PVP₁₀ polimer borítása szterikus kölcsönhatásokat, az AgNP@GT₁₀ rendszer zöld tea extraktuma pedig elektrosztatikus stabilizációt alakított ki a részecskék körül. A részecskeméret jelentőségének modellezése érdekében a citrát csoportokkal stabilizált szorból magnövesztéses módszerrel két további, átlagosan 20, illetve 50 nm átmérőjű AgNP diszperziót alakítottunk ki. Az öt minta TEM és UV-Vis segítségével elvégzett kémiai karakterizálása során bebizonyosodott, hogy a részecskék kémiai összetétele, morfológiája és kristályszerkezete nagyon hasonló, lényeges eltéréseket csak a kívánt paraméterek mentén figyeltünk meg, így elvégezhetjük az elkészített ezüst nanorészecskék aggregációs viselkedésének tanulmányozását DLS és zéta-potenciál mérések segítségével.

Az aggregációs vizsgálatokat különböző pH értékeken, NaCl, glükóz és glutamin koncentrációkon végeztük, illetve az összetett, élő rendszerek közelebbi jellemzése érdekében olyan *in vitro* sejtmedium alkotók hatását is megvizsgáltuk, mint a DMEM és az FBS. Az eredmények összegzése a 36. ábrán látható, ahol leolvasható, hogy az egyes biológiailag releváns körülmények változása mennyire szélsőségesen képes módosítani a minták stabilitását. Az aggregáció mértékét a 24 óra elteltével kapott átlagos hidrodinamikai átmérők nagyságával szemléltettük és 4 zónára osztottuk: zöld szín jelöli azt, ahol a D_h 250 nm alatt maradt, vagy nem

beszélhetünk jelentős aggregációról, citromsárga színnel jelöltük az enyhe aggregációt, ahol az aggregátumok mérete 250 és 500 nm közöttinek adódott, közepesen erős aggregációnál (narancssárga) az átlagos hidrodinamikai átmérők 500 és 1000 nm között voltak, az erős aggregációról pedig mikronos aggregátumok megjelenésétől beszélünk (piros). Ezeken felül jelöltük az ezüst-klorid képződését, és a biomolekulák felületi adszorpcióját is.

	AgNP@GT ₁₀	AgNP@PVP ₁₀	AgNP@C ₁₀	AgNP@C ₂₀	AgNP@C ₅₀
pH					
NaCl					
Glükóz					
Glutamin					
DMEM					
FBS					
DMEM + FBS					
Hosszantartó toxicitás		AgCl! 			

 Nincs/nem számottevő aggregáció
 Enyhe aggregáció
 Közepesen erős aggregáció
 Erős aggregáció
 AgCl csapadék képződés
 Korona effektus

36. ábra Az aggregációs és *in vitro* toxicitás vizsgálatok eredményeinek összefoglalása

Kolloidstabilitás szempontjából az elektrosztatikusan stabilizált részecskék bizonyultak a legkiszolgáltatottabbnak a környezeti körülmények változására. A részecskék méretétől függetlenül mind az erősen savas pH, mind a fiziológias sókoncentráció mikronos aggregátumokat idézett elő a rendszerekben, habár a részecskeméret növekedése enyhén ellensúlyozta az aggregátumnövekedés mértékét. A citrátos kolloidokkal szemben a sztérikus és elektrosztérikus minták kolloidstabilitása jóval erősebbnek bizonyult, elektrosztérikus esetben a legszélsőségesebb körülmények között is csak enyhe méretnövekedést tapasztaltunk.

A kisméretű biomolekulák (glükóz és glutamin) képesek voltak a részecskék felületére adszorbeálódni, amely a legtöbb esetben nem módosította a részecskék kolloidstabilitását, habár a zöld teával stabilizált rendszer glutamin jelenlétében enyhe aggregátumnövekedést mutatott, amely

a részecskék „natív biomolekuláris koronájának” átrendeződésére utalt. Az AgNP@PVP₁₀ minta sajátos hátrányának bizonyult, hogy minden kísérlet során AgCl csapadékképződést figyeltük meg, így annak ellenére, hogy a polimer által biztosított sztérikus kölcsönhatások erős kolloidstabilitást biztosítottak a részecskéknek, a kémiai stabilitásukat már nem tudta garantálni.

Az eddig felsorolt egyszerűbb körülmények jó modell rendszereknek bizonyultak az *in vitro* kísérleteknél használt komponensek eredményeinek értelmezésére. A DMEM médium nátrium-kloridhoz hasonló aggregációt eredményezett, amely a citráttal stabilizált részecskék esetén jól szemléltette a primer részecskeméret növelésével csökkenő aggregációs készséget, amely a nagyobb részecskék alacsonyabb felületi energiájával magyarázható.

Összetett makromolekulák vizsgálatakor, mint az FBS szérumban, biomolekuláris koronaképződést figyeltünk meg, amelynek jelentősége jól megfigyelhető a 36. ábra 6-8. sorában. A kialakuló koronák képesek voltak az aggregációra hajlamos részecskék kolloidstabilitását javítani a megnövekedett sókoncentrációval szemben, így az AgNP@C₅₀ mintát a nagy primer részecskeméretnek és a koronaképződésnek köszönhetően lényegében stabilnak tekinthettük. Az AgNP@PVP₁₀ minta esetén megfigyelt klaszterek jelenléte arra utalt, hogy habár a kísérlethez háttérelektrolitként használt NaCl képes volt a csapadékképződés elindítására, a biomolekuláris koronák képesek a részecskék kémiai stabilitásának bizonyos mértékű javítására. Végezetül az elektrosztérikusan stabilizált AgNP@GT₁₀ kolloid-, és kémiai stabilitása is megfelelőnek bizonyult az előidézett bioreleváns körülmények között, bemutatva a zöld tea mátrix erős stabilizáló hatását.

Az *in vitro* vizsgálatok során a kolloid mintáinkat meghatározott időtartamokra 150 mM NaCl oldattal kezeltük, hogy megfigyelhessük a kolloidstabilitás (illetve AgNP@PVP₁₀ esetén kémiai stabilitás) közvetlen hatását a részecskék toxicitására (36. ábra alsó sora). Az MTT esszék és mikrodilúciós vizsgálatok tendenciáiban és az aggregációs vizsgálatok eredményeiben olyan analógiák jelentek meg, amelyek bizonyították a feltételezésünket, miszerint a részecskeaggregációnak közvetlenül mérhető és erőteljes hatása van a biológiai aktivitásra.

A részecskeméret növelésével erősödő kolloidstabilitás a részecskék hosszantartó toxicitásában is megmutatkozott, ami alapvetően ellentétes következtetésekhez vezet, mint a szakirodalom általános nézőpontja, miszerint a toxicitás maximalizálásának érdekében minél kisebb nanorészecskék alkalmazása a cél. A megfigyeléseink szerint sokkal inkább egyfajta kompromisszumos megközelítésre van szükség, amely az optimális részecskeméret meghatározásánál a primer toxicitást és a kolloidstabilitást is figyelembe veszi.

Az eltérő stabilizálószerke összehasonlításából azokat a következtetéseket vontuk le, hogy az ezüst nanorészecskéek orvosbiológiai és környezeti alkalmazásai kapcsán a megfelelő adszorbensek alkalmazása több szempontból is jelentős tényező. A citrát csoportokkal kialakított elektrosztatikus stabilitás, általános elterjedtsége ellenére, túlságosan érzékenynek bizonyult a környezet változásaira, a polivinil-pirrolidonnal stabilizált részecskéek pedig erős fennmaradó toxicitásuk ellenére, a megfigyelt csapadékképződés miatt válhatnak rizikóssá. A zöld tea extraktummal stabilizált részecskéek ezekkel szemben egyszerre erős toxicitást és kémiai stabilitást demonstráltak. Összességében azt mondhatjuk, hogy a részecskéek kolloidstabilitásának biztosítása érdekében előnyösebb a sztérikus, vagy elektrosztérikus kölcsönhatásokat biztosító stabilizálószerke alkalmazása, ezen felül az adszorbensek anyagi minősége a részecskéek kémiai stabilitását is befolyásolhatja; a csapadékképződés elkerülése érdekében, a kísérleti rendszerünkben elektrosztatikus kölcsönhatásokra volt szükség.

Az ezüst nanorészecskéek biológiai hasznosíthatósága egy nagyon összetett terület, amelyben a részecskéek kolloidális és kémiai stabilitása olyan fontos tényezők, amelyeket a kísérleti eredményeink alapján a megfelelő kialakítás és a részecskéekkel kölcsönhatásba kerülő biológiai rendszer is befolyásol. A bioreleváns stabilitás szempontjából a részecskeméret növelése és az elektrosztérikus stabilizáció kialakítása hasznos stratégiáknak bizonyulhatnak, amelyek már a szintézismódszerek megtervezésekor figyelembevehetők, minden szempontból ellenálló termékeket kialakítva. Emellett azonban nem elhanyagolható az élő rendszereknél jellemző biomolekuláris koronaképződés, amely biológiai jelölőfunkciója mellett erőteljesen befolyásolhatja az ezüst nanorészecskéek kolloid-, és kémiai stabilitását is.

A doktori értekezésem célja a bio-nano határterületi kutatásokban sok esetben háttérbe szoruló részecskeaggregáció tárgyalása volt. A kutatás rávilágított arra, hogy a valóság sokkal összetettebb, mint elsőre feltételeznénk, szemléltetve, hogy ezen az újszerű, és nagy potenciállal rendelkező területen számos aspektus létezik, amelyek mélyreható megismeréséhez különböző szemléletmódok találkozására van szükség. Remélem, hogy az itt bemutatott munka hozzájárulhat ezeknek a nézőpontoknak a találkozásához.

7. SUMMARY

Due to their excellent biological activity, silver nanoparticles (AgNPs) are considered as one of the most influential inorganic nanosized materials in biomedical applications. However, in this field of research, the topic of nanoparticle aggregation is often overlooked even though biological and environmental systems do not present ideal conditions for the colloidal stability of nanoparticles. Additionally, nanoparticle stability can be affected by parameters such as particle size, furthermore, by the quality and quantity of the surface stabilizing agents, which are factors of interest in bio-nano investigations to begin with.

The aim of this research was to synthesize and compare several silver nanoparticle samples of varying particle size and surface capping, and to investigate the impact of these properties on the biorelevant colloidal stability of such materials. In addition, the direct influence of AgNP aggregation on cytotoxicity and antimicrobial activity was also investigated by *in vitro* viability assays.

The first phase of the research work was the production of three silver nanoparticle samples in diameters of approximately 10 nm, with differing surface stabilization: the electrostatic repulsion provided by citrate groups in AgNP@C₁₀, another sol sterically stabilized by polyvinyl pyrrolidone (PVP) was labeled as AgNP@PVP₁₀, and AgNP@GT₁₀ denoted an electrosteric nanosilver colloid synthesized with the help of green tea extract. The investigation of the effect of particle size was achieved by the utilization of two further nanosilver colloids obtained by a two-step seed-mediated growth of AgNP@C₁₀ that generated citrate capped silver nanoparticles of 20 and 50 nm in diameter, respectively. The chemical characterization of the five colloid samples by TEM and UV-Vis spectroscopy verified the identical chemical composition, similar morphology, and crystallinity of the particles, with key differences demonstrated only along the characteristics in question. As the synthesis methods proved successful, the comparative colloidal stability analysis of the particles by DLS and zeta potential measurements could commence.

The aggregation behavior measurements were performed on various pH values, NaCl, glucose and glutamine concentrations, furthermore cell culture components DMEM and FBS were utilized to assess the behavior of AgNPs in “closer to life” conditions. From a colloidal standpoint, citrate capped silver nanoparticles proved to be the most susceptible towards the changes of their environment. Regardless of their diameter, strongly acidic pH and physiological NaCl concentration were sufficient for generating micron sized aggregates in all three AgNP@C

samples, although the growth of primer particle size could counteract the severity of external impulses. However, both the steric and electrosteric samples demonstrated greater colloidal stability, with AgNP@GT₁₀ showing only moderate aggregation against even the most severe experimental conditions.

The small biomolecules involved in our experiments, namely glucose and glutamine could be adsorbed on the surface of the silver nanoparticles from the sample, albeit it did not affect the colloidal stability of either colloid substantially. The interaction of the green tea matrix and glutamine caused a slight increase in the average hydrodynamic diameter of AgNP@GT₁₀, indicating internal changes within the “native biomolecular corona” of these particles. In case of the AgNP@PVP₁₀ sample we observed a unique, rather disadvantageous issue throughout the experiments, which was the formation of AgCl in the presence of sodium chloride; even though the colloidal stability provided by the capping polymer was substantial, indication of the sub-par chemical stability was frequently observed.

In the discussion and understanding of *in vitro* cell culture components, the experiments performed on the simpler model systems proved useful, as strong analogies were observed among them. DMEM induced aggregation similarly to NaCl due to their similar chemical composition. Highlighting the effect of primer particle size on aggregation propensity, the three differently sized particles demonstrated distinct aggregation grades in the environment of the medium; larger particles showed greater colloidal stability compared to smaller ones, explained by their lower surface energy.

The addition of the complex mixture of biomolecules in FBS led to biomolecular corona formation and this adsorption layer could counteract aggregation within the susceptible samples to an extent, culminating in the experiment using AgNP@C₅₀ in FBS and DMEM mixture, where the otherwise sensitive nanoparticles could maintain colloidal stability due to their larger size and corona formation. The clusters observed in the AgNP@PVP₁₀ sample within the milieu of FBS implied, that corona formation can help improving chemical stability: even though low NaCl content - such as the 10 mM background concentration - was sufficient to initiate AgCl precipitation, the present biomolecules of FBS could somewhat preserve the integrity of the particles. Ultimately, the colloid entitled AgNP@GT₁₀ demonstrated the greatest colloidal and chemical stability against biorelevant conditions, underlining the strong protection provided by the electrosteric interactions of green tea.

Throughout the *in vitro* experiments, the nanosilver samples were incubated with 150 mM NaCl for certain time intervals to observe the direct effect of colloidal stability (and in the case of AgNP@PVP₁₀ chemical stability as well) on their cytotoxicity and antimicrobial activity. The MTT and microdilution assays showed strong correlations with the aggregation experiments, verifying the notion that nanoparticle aggregation has a profound and strong effect on biological activity.

The growing strength of colloidal stability due to the increase of primer particle size manifested also in the form of prolonged biological activity, is in stark contrast with the general stance of the relevant literature, where often the objective is maximizing the intrinsic toxicity of nanoparticles, by utilizing particles in sizes as small as possible. According to our observations, a better approach would aim for an “optimal nanoparticle size” and would consider the trade-off between intrinsic toxicity and longevity provided by colloidal stability.

Through the comparison of the various stabilizing agents used within our experiments, we have arrived at the conclusion that multiple aspects should be considered when selecting the optimal capping materials. Despite its widespread use, citrate capping proved heavily susceptible toward changes in the surrounding environment, and even though PVP provided strong and long-lasting colloidal stability to its respective nanoparticles, the use of AgNP@PVP₁₀ could prove risky due to the observed AgCl precipitation. In contrast, the silver nanoparticles stabilized by green tea extract demonstrated strong biorelevant colloidal and chemical stability at the same time. In conclusion, our findings indicate that in order to provide strong colloidal stability, steric or electrosteric stabilization is needed, furthermore, the chemical composition of the capping agents might also affect the chemical stability of nanosilver. Within our experimental conditions, electrostatic interactions were necessary to counteract AgCl precipitation.

The biological utilization of silver nanoparticles is a very intricate field of research, in which the colloidal and chemical stability of the particles are essential features affected both by as-prepared characteristics and the interfering biological systems, according to our investigations. From the standpoint of biorelevant stability, the increase of primary particle size and the formation of proper electrosteric stabilization are important factors to be considered in preparing all-around reliable nanoparticle systems. Next to these deliberate and customizable properties, the biomolecular corona formation relevant in living and environmental systems must also be highlighted, which has the ability to modify the colloidal and chemical integrity of silver nanoparticles and should not be considered solely as markers for biological processes.

The main goal of my doctoral thesis was discussing nanoparticle aggregation, a topic often neglected in bio-nano research. As the contribution pointed out, reality is much more complex than we often realize, indicating how understanding the numerous aspects of this novel field requires the cooperation of different scientific viewpoints. My hope for the present work is to make precedent for such interdisciplinary investigations.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori értekezésemhez vezető munkában rengeteg segítséget kaptam az évek során, ami nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el. Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőimnek, *Dr. Kónya Zoltán* tanszékvezető egyetemi tanárnak és *Dr. Kiricsi Mónika* egyetemi adjunktusnak, akik alapképzéses éveimtől kezdve szakértelmükkel, tanácsaikkal, valamint az Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék, illetve a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék erőforrásainak segítségével folyamatosan segítették a kutatómunkámat és szakmai fejlődésemet.

Hálával tartozom *Dr. Rónavári Andreának*, akinek köszönhetően rengeteget fejlődhettem a tudományos kutatómunkához kapcsolódó feladatkörök minden területén az éveken át tartó közös munka során.

Köszönöm szépen *Igaz Nórának*, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársának az MTT viabilitási tesztek kapcsán nyújtott állhatatos segítségért, továbbá köszönöm *Dr. Pfeiffer Ilona* és *Szerencsés Bettina* segítségét és szakértelmét, illetve, hogy lehetővé tették az antimikrobiális kísérletek elvégzését a Mikrobiológiai Tanszék erőforrásain keresztül.

Köszönettel tartozom *Dr. Tóth Ildikónak*, aki a doktori kutatási témám körvonalazódásakor szakértelmével alapvető fontosságú segítséget nyújtott a kísérletek tervezésében és eredmények értelmezésében.

Hálás vagyok *Mihály Ákosnak*, *Resch Viviennek*, *Kovács Nikolett Alexandrának*, *Boka Eszternek* és *Zakupszky Dalmának*, akik az évek során hallgatókként bekapcsolódtak a kutatás bizonyos részeibe, továbbá köszönöm a segítséget az Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék összes munkatársának.

Végezetül hálásan köszönöm a családom és barátaim támogatását, akik az évek során mellettem voltak és támogattak ezen a sokszor rögzös úton, különösképp a nagymamámnak, aki ugyan már több mint egy évtizede nincs köztünk, viszont, ha kisgyerekként nem visz el a kémia szertárba papírhajót égetni nátriummal, lehet nem írom most ezeket a sorokat.

A disszertáció az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-4-SZTE-580 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics. *Eng Sci*. 1960;23(5):22-36.
2. Rogers B, Adams J, Pennathur S. *Nanotechnology: Understanding Small Systems, Third Edition.*; 2014.
3. Hochella MF, Mogk DW, Ranville J, et al. Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. *Science* (80-). 2019;363(6434). doi:10.1126/science.aau8299
4. Santos CSC, Gabriel B, Blanchy M, et al. Industrial Applications of Nanoparticles - A Prospective Overview. In: *Materials Today: Proceedings*. Vol 2. Elsevier Ltd; 2015:456-465. doi:10.1016/j.matpr.2015.04.056
5. Sengul AB, Asmatulu E. Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review. *Environ Chem Lett*. 2020;18(5):1659-1683. doi:10.1007/s10311-020-01033-6
6. Kovács D, Igaz N, Keskeny C, et al. Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis. *Sci Rep*. 2016;6:27902. doi:10.1038/srep27902
7. Medici S, Peana M, Nurchi VM, Zoroddu MA. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *J Med Chem*. 2019;62(13):5923-5943. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01439
8. Abou El-Nour KMM, Eftaiha A, Al-Warthan A, Ammar RAA. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arab J Chem*. 2010;3(3):135-140. doi:10.1016/j.arabjc.2010.04.008
9. Pulit-Prociak J, Stokłosa K, Banach M. Nanosilver products and toxicity. *Environ Chem Lett*. 2014;13:59-68. doi:10.1007/s10311-014-0490-2
10. Hotze EM, Phenrat T, Lowry G V. Nanoparticle Aggregation: Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment. *J Environ Qual*. 2010;39(6):1909-1924. doi:10.2134/jeq2009.0462
11. Szántó F. *Kolloidika*. Budapest: Tankönyvkiadó Vállalat; 1966.
12. Alshammari A, Kalevaru VN. Supported Gold Nanoparticles as Promising Catalysts. In: *Catalytic Application of Nano-Gold Catalysts*. InTech; 2016. doi:10.5772/64394
13. Pryshchepa O, Pomastowski P, Buszewski B. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Adv Colloid Interface Sci*. 2020;284:102246. doi:10.1016/j.cis.2020.102246
14. Ferris JP, Ertem G. Oligomerization of ribonucleotides on montmorillonite: Reaction of the 5'-phosphorimidazolidine of adenosine. *Science* (80-). 1992;257(5075):1387-1389. doi:10.1126/science.1529338
15. Oleson TA, Sahai N, Pedersen JA. Electrostatic effects on deposition of multiple phospholipid bilayers at oxide surfaces. *J Colloid Interface Sci*. 2010;352(2):327-336.

doi:10.1016/j.jcis.2010.08.057

16. Xu J, Campbell JM, Zhang N, Hickey WJ, Sahai N. Did mineral surface chemistry and toxicity contribute to evolution of microbial extracellular polymeric substances? *Astrobiology*. 2012;12(8):785-798. doi:10.1089/ast.2011.0776
17. Sahai N, Kaddour H, Dalai P, Wang Z, Bass G, Gao M. Mineral Surface Chemistry and Nanoparticle-aggregation Control Membrane Self-Assembly. *Sci Rep*. 2017;7(43418):1-13. doi:10.1038/srep43418
18. Hochella MF, Aruguete D, Kim B, Madden AS. Naturally occurring inorganic nanoparticles: General assessment and a global budget for one of earth's last unexplored major geochemical components. In: *Nature's Nanostructures*. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.; 2012:1-42. doi:10.1201/b11618-3
19. Dearing JA, Hay KL, Baban SMJ, Huddleston AS, Wellington EMH, Loveland PJ. Magnetic susceptibility of soil: an evaluation of conflicting theories using a national data set. *Geophys J Int*. 1996;127(3):728-734. doi:10.1111/j.1365-246X.1996.tb04051.x
20. Schindler M, Hochella MF. Soil memory in mineral surface coatings: Environmental processes recorded at the nanoscale. *Geology*. 2015;43(5):415-418. doi:10.1130/G36577.1
21. Lebreton LCM, Van Der Zwet J, Damsteeg JW, Slat B, Andrady A, Reisser J. River plastic emissions to the world's oceans. *Nat Commun*. 2017;8:1-10. doi:10.1038/ncomms15611
22. Mattsson K, Hansson LA, Cedervall T. Nano-plastics in the aquatic environment. *Environ Sci Process Impacts*. 2015;17(10):1712-1721. doi:10.1039/c5em00227c
23. Chae Y, Kim D, Kim SW, An YJ. Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. *Sci Rep*. 2018;8:284. doi:10.1038/s41598-017-18849-y
24. Keller AA, Lazareva A. Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. *Environ Sci Technol Lett*. 2013;1(1):65-70. doi:10.1021/ez400106t
25. Dhall A, Self W. Cerium oxide nanoparticles: A brief review of their synthesis methods and biomedical applications. *Antioxidants*. 2018;7(8). doi:10.3390/antiox7080097
26. Huber D. Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles. *Small*. 2005;1(5):482-501. doi:10.1002/sml.200500006
27. Ziental D, Czarczynska-Goslinska B, Mlynarczyk DT, et al. Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine. *Nanomaterials*. 2020;10(2):387. doi:10.3390/nano10020387
28. Jeelani PG, Mulay P, Venkat R, Ramalingam C. Multifaceted Application of Silica Nanoparticles. A Review. *Silicon*. 2020;12:1337-1354. doi:10.1007/s12633-019-00229-y
29. Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol*. 2005;146(6):882-893. doi:10.1038/sj.bjp.0706386

30. Hussein M, Gamal F, Arisha A. Some Biological and Biomedical Effects of Nanoparticles. *Zagazig Vet J.* 2020;48(4):433-447. doi:10.21608/zvjz.2020.23011.1099
31. Nel A. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* (80-). 2006;311(5761):622-627. doi:10.1126/science.1114397
32. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/8416763
33. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113(7):823-839. doi:10.1289/ehp.7339
34. Donaldson K, Tran CL. Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol.* 2002;14(1):5-27. doi:10.1080/089583701753338613
35. Tian R, Xu J, Luo Q, Hou C, Liu J. Rational Design and Biological Application of Antioxidant Nanozymes. *Front Chem.* 2021;8:831. doi:10.3389/fchem.2020.00831
36. Dasgupta S, Auth T, Gompper G. Shape and orientation matter for the cellular uptake of nonspherical particles. *Nano Lett.* 2014;14(2):687-693. doi:10.1021/nl403949h
37. Nejati S, Mohseni Vadeghani E, Khorshidi S, Karkhaneh A. Role of particle shape on efficient and organ-based drug delivery. *Eur Polym J.* 2020;122:109353. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.109353
38. Huo S, Jin S, Ma X, et al. Ultrasmall gold nanoparticles as carriers for nucleus-based gene therapy due to size-dependent nuclear entry. *ACS Nano.* 2014;8(6):5852-5862. doi:10.1021/nn5008572
39. Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res Lett.* 2018;13. doi:10.1186/s11671-018-2457-x
40. Zhao X, Ng S, Heng BC, et al. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. *Arch Toxicol.* 2013;87(6):1037-1052. doi:10.1007/s00204-012-0827-1
41. Li C, Wang J, Wang Y, et al. Recent progress in drug delivery. *Acta Pharm Sin B.* 2019;9(6):1145-1162. doi:10.1016/j.apsb.2019.08.003
42. Misra SK, Dybowska A, Berhanu D, Luoma SN, Valsami-Jones E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Sci Total Environ.* 2012;438:225-232. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.08.066
43. Ahn EY, Jin H, Park Y. Assessing the antioxidant, cytotoxic, apoptotic and wound healing properties of silver nanoparticles green-synthesized by plant extracts. *Mater Sci Eng C.* 2019;101:204-216. doi:10.1016/j.msec.2019.03.095
44. Senapati VA, Kumar A. ZnO nanoparticles dissolution, penetration and toxicity in human epidermal cells. Influence of pH. *Environ Chem Lett.* 2018;16:1129-1135. doi:10.1007/s10311-018-0736-5
45. Seoudi R, Shabaka A, El Sayed ZA, Anis B. Effect of stabilizing agent on the morphology

and optical properties of silver nanoparticles. *Phys E Low-Dimensional Syst Nanostructures*. 2011;44(2):440-447. doi:10.1016/j.physe.2011.09.018

46. Badawy AM El, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environ Sci Technol*. 2010;44(4):1260-1266. doi:10.1021/es902240k
47. El Badawy AM, Scheckel KG, Suidan M, Tolaymat T. The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Sci Total Environ*. 2012;429:325-331. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.03.041
48. Schaeublin NM, Braydich-Stolle LK, Schrand AM, et al. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale*. 2011;3(2):410-420. doi:10.1039/c0nr00478b
49. Hadjidemetriou M, Kostarelos K. Evolution of the nanoparticle corona. *Nat Nanotechnol*. 2017;12:288-290. doi:10.1038/nnano.2017.61
50. Bangham AD, Pethica BA, Seaman G V. The charged groups at the interface of some blood cells. *Biochem J*. 1958;69(1):12-19. doi:10.1042/bj0690012
51. Vroman L. Effect of Adsorbed Proteins on the Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids. *Nature*. 1962;196(4853):476-477. doi:10.1038/196476a0
52. Riviere JE, Scoglio C, Sahneh FD, Monteiro-Riviere NA. Computational approaches and metrics required for formulating biologically realistic nanomaterial pharmacokinetic models. *Comput Sci Discov*. 2013;6(1):014005. doi:10.1088/1749-4699/6/1/014005
53. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(38):14265-14270. doi:10.1073/pnas.0805135105
54. Szekeres GP, Kneipp J. SERS Probing of Proteins in Gold Nanoparticle Agglomerates. *Front Chem*. 2019;7(30). doi:10.3389/fchem.2019.00030
55. Park SJ. Protein–nanoparticle interaction: Corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:5783-5802. doi:10.2147/IJN.S254808
56. Fadare OO, Wan B, Liu K, Yang Y, Zhao L, Guo LH. Eco-Corona vs Protein Corona: Effects of Humic Substances on Corona Formation and Nanoplastic Particle Toxicity in *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol*. 2020;54(13):8001-8009. doi:10.1021/acs.est.0c00615
57. Pulido-Reyes G, Leganes F, Fernández-Piñas F, Rosal R. Bio-nano interface and environment: A critical review. *Env Toxicol Chem*. 2017;36(12):3181-3193. doi:10.1002/etc.3924
58. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>. Accessed February 15, 2021.

59. Tanaka T. *Experimental Methods in Polymer Science*. Elsevier; 2000. doi:10.1016/C2009-0-22460-3
60. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
61. Soltanian S, Sheikhabaei M, Mohamadi N, Pabarja A, Abadi MFS, Tahroudi MHM. Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Hertia intermedia* and Evaluation of its Cytotoxic and Antimicrobial Activities. *Bionanoscience*. January 2021:1-11. doi:10.1007/s12668-020-00816-z
62. Heble AY, Santelli J, Armstrong AM, Mattrey RF, Lux J. Catalase-Loaded Silica Nanoparticles Formulated via Direct Surface Modification as Potential Oxygen Generators for Hypoxia Relief. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(5):5954. doi:10.1021/acsami.0c19633
63. Shejawal KP, Randive DS, Bhinge SD, et al. Green synthesis of silver, iron and gold nanoparticles of lycopene extracted from tomato: their characterization and cytotoxicity against COLO320DM, HT29 and Hella cell. *J Mater Sci Mater Med*. 2021;32(19). doi:10.1007/s10856-021-06489-8
64. McGinnity TL, Sokolova V, Prymak O, Nallathamby PD, Epple M, Roeder RK. Colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake of HfO₂ nanoparticles. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2021;1(11). doi:10.1002/jbm.b.34800
65. Santonocito D, Raciti G, Campisi A, et al. Astaxanthin-Loaded Stealth Lipid Nanoparticles (AST-SSLN) as Potential Carriers for the Treatment of Alzheimer's Disease: Formulation Development and Optimization. *Nanomaterials*. 2021;11(2):391. doi:10.3390/nano11020391
66. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
67. Balcucho J, Narváez DM, Castro-Mayorga JL. Antimicrobial and Biocompatible Polycaprolactone and Copper Oxide Nanoparticle Wound Dressings against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Nanomaterials*. 2020;10(9):1692. doi:10.3390/nano10091692
68. Yurtdaş-Kırımlıoğlu G, Görgülü Ş. Surface modification of PLGA nanoparticles with chitosan or Eudragit® RS 100: Characterization, prolonged release, cytotoxicity, and enhanced antimicrobial activity. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;61:102145. doi:10.1016/j.jddst.2020.102145
69. Fadwa AO, Alkoblan DK, Mateen A, Albarag AM. Synergistic effects of zinc oxide nanoparticles and various antibiotics combination against *Pseudomonas aeruginosa* clinically isolated bacterial strains. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(1):928-935. doi:10.1016/j.sjbs.2020.09.064
70. Essawy E, Abdelfattah MS, El-Matbouli M, Saleh M. Synergistic Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles and Natural Phenolic Compounds against Drug-Resistant Fish

- Pathogens and Their Cytotoxicity: An In Vitro Study. *Mar Drugs*. 2021;19(1):22. doi:10.3390/md19010022
71. Kukut Hatipoglu M, Kelestemur S, Altunbek M, Culha M. Source of cytotoxicity in a colloidal silver nanoparticle suspension. *Nanotechnology*. 2015;26(19):195103. doi:10.1088/0957-4484/26/19/195103
 72. Barbasz A, Oćwieja M, Barbasz J. Cytotoxic Activity of Highly Purified Silver Nanoparticles Sol Against Cells of Human Immune System. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;176(3):817-834. doi:10.1007/s12010-015-1613-3
 73. Parak WJ. Characterizing the multidisciplinary of nanoscience research. *ACS Nano*. 2010;4(8):4333-4334. doi:10.1021/nn1019225
 74. Holec D, Dumitraschkewitz P, Vollath D, Fischer FD. Surface Energy of Au Nanoparticles Depending on Their Size and Shape. *Nanomaterials*. 2020;10(3):484. doi:10.3390/nano10030484
 75. He YT, Wan J, Tokunaga T. Kinetic stability of hematite nanoparticles: The effect of particle sizes. *J Nanoparticle Res*. 2008;10:321-332. doi:10.1007/s11051-007-9255-1
 76. Tsuda A, Konduru NV. The role of natural processes and surface energy of inhaled engineered nanoparticles on aggregation and corona formation. *NanoImpact*. 2016;2:38-44. doi:10.1016/j.impact.2016.06.002
 77. Buffle I, Leppard GG. Characterization of Aquatic Colloids and Macromolecules. 1. Structure and Behavior of Colloidal Material. *Environ Sci Technol*. 1995;29(9):2169-2175. doi:10.1021/es00009a004
 78. Elimelech M, Jia X, Gregory J, Williams RA. *Particle Deposition and Aggregation: Measurement, Modelling and Simulation (Colloid and Surface Engineering)*. 1st ed. (Elimelech M, Gregory J, Jia X, Williams RA, eds.). London: Butterworth-Heinemann; 1995.
 79. Israelachvili JN. *Intermolecular and Surface Forces*. 3rd ed. London: Academic Press; 2011.
 80. Graf P, Manton A, Foelske A, et al. Peptide-Coated Silver Nanoparticles: Synthesis, Surface Chemistry, and pH-Triggered, Reversible Assembly into Particle Assemblies. *Chem - A Eur J*. 2009;15:5831-5844. doi:10.1002/chem.200802329
 81. Ohshima H. *Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces*. John Wiley & Sons, Inc.; 2012. doi:10.1002/9781118135440
 82. Phenrat T, Kim HJ, Fagerlund F, Illangasekare T, Tilton RD, Lowry G V. Particle size distribution, concentration, and magnetic attraction affect transport of polymer-modified Fe₀ nanoparticles in sand columns. *Environ Sci Technol*. 2009;43(13):5079-5085. doi:10.1021/es900171v
 83. Hoek EMV, Agarwal GK. Extended DLVO interactions between spherical particles and rough surfaces. *J Colloid Interface Sci*. 2006;298(1):50-58. doi:10.1016/j.jcis.2005.12.031
 84. Fritz G, Schädler V, Willenbacher N, Wagner NJ. Electrosteric stabilization of colloidal

- dispersions. *Langmuir*. 2002;18(16):6381-6390. doi:10.1021/la015734j
85. Chen KL, Elimelech M. Interaction of fullerene (C60) nanoparticles with humic acid and alginate coated silica surfaces: Measurements, mechanisms, and environmental implications. *Environ Sci Technol*. 2008;42(20):7607-7614. doi:10.1021/es8012062
 86. Hierrezuelo J, Sadeghpour A, Szilágyi I, Vaccaro A, Borkovec M. Electrostatic stabilization of charged colloidal particles with adsorbed polyelectrolytes of opposite charge. *Langmuir*. 2010;26(19):15109-15111. doi:10.1021/la102912u
 87. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337-351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
 88. Malvern instruments. *Zetasizer Nano Series User Manual*.; 2004. doi:10.1016/S0294-3506(99)80105-7
 89. Delgado A V., González-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena: (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem*. 2005;77(10):1753-1805. doi:10.1351/pac200577101753
 90. Galli M, Sáringer S, Szilágyi I, Trefalt G. A simple method to determine critical coagulation concentration from electrophoretic mobility. *Colloids and Interfaces*. 2020;4(2):20. doi:10.3390/colloids4020020
 91. Guehrs E, Schneider M, Günther CM, et al. Quantification of silver nanoparticle uptake and distribution within individual human macrophages by FIB/SEM slice and view. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1). doi:10.1186/s12951-017-0255-8
 92. Shahabadi N, Zendehecheshm S, Khademi F, Rashidi K, Chehri K, Fatahi dehpahni M. Green synthesis of Chloroxine-conjugated silver nanoflowers: Promising antimicrobial activity and in vivo cutaneous wound healing effects. *J Environ Chem Eng*. 2021;9(3):105215. doi:10.1016/j.jece.2021.105215
 93. Bulla SS, Bhajantri RF, Chavan C. Optical and Structural Properties of Biosynthesized Silver Nanoparticle Encapsulated PVA (Ag–PVA) Films. *J Inorg Organomet Polym Mater*. February 2021:1-13. doi:10.1007/s10904-021-01909-2
 94. Yang SE, Liu P, Zhang YJ, Guo QN, Chen YS. Effects of silver nanoparticles size and shape on light scattering. *Optik (Stuttg)*. 2016;127(14):5722-5728. doi:10.1016/j.ijleo.2016.03.071
 95. Chun S, Grudinin D, Lee D, Kim SH, Yi GR, Hwang I. Roll-to-roll printing of silver oxide pastes and low temperature conversion to silver patterns. *Chem Mater*. 2009;21(2):343-350. doi:10.1021/cm802475m
 96. Švecová M, Ulbrich P, Dendisová M, Matějka P. SERS study of riboflavin on green-synthesized silver nanoparticles prepared by reduction using different flavonoids: What is the role of flavonoid used? *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2018;195:236-245. doi:10.1016/j.saa.2018.01.083
 97. Ng KM, Chau SL, Tang HW, et al. Ion-Desorption Efficiency and Internal-Energy Transfer in Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization: More Implication(s) for the

- Thermal-Driven and Phase-Transition-Driven Desorption Process. *J Phys Chem C*. 2015;119(41):23708-23720. doi:10.1021/acs.jpcc.5b05957
98. Yang M, Hashimoto K, Fujino T. Silver nanoparticles loaded on ammonium exchanged zeolite as matrix for MALDI-TOF-MS analysis of short-chain n-alkanes. *Chem Phys Lett*. 2018;706:525-532. doi:10.1016/j.cplett.2018.07.002
 99. Yang P, Xu Y, Chen L, et al. Encapsulated Silver Nanoparticles Can Be Directly Converted to Silver Nanoshell in the Gas Phase. *Nano Lett*. 2015;15(12):8397-8401. doi:10.1021/acs.nanolett.5b04328
 100. Kang W, Cheng C, Li Z, Feng Y, Shen G, Du X. Ultrafine Ag Nanoparticles as Active Catalyst for Electrocatalytic Hydrogen Production. *ChemCatChem*. 2019;11(24):5976-5981. doi:10.1002/cctc.201901364
 101. Gordon O, Slenters TV, Brunetto PS, et al. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: Thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4208-4218. doi:10.1128/AAC.01830-09
 102. Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Häse CC. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(8):2668-2670. doi:10.1128/AAC.46.8.2668-2670.2002
 103. Park HJ, Kim JY, Kim J, et al. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Res*. 2009;43(4):1027-1032. doi:10.1016/j.watres.2008.12.002
 104. Vankayala R, Kuo CL, Sagadevan A, Chen PH, Chiang CS, Hwang KC. Morphology dependent photosensitization and formation of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) by gold and silver nanoparticles and its application in cancer treatment. *J Mater Chem B*. 2013;1(35):4379-4387. doi:10.1039/c3tb20806k
 105. Geonmonond RS, Da Silva AGM, Camargo PHC. Controlled synthesis of noble metal nanomaterials: motivation, principles, and opportunities in nanocatalysis. *An Acad Bras Cienc*. 2018;90(1 suppl 1):719-744. doi:10.1590/0001-3765201820170561
 106. Wiley B, Sun Y, Mayers B, Xia Y. Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. *Chem - A Eur J*. 2005;11(2):454-463. doi:10.1002/chem.200400927
 107. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(6):1712-1720. doi:10.1128/AEM.02218-06
 108. Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, et al. Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro. Quigg A, ed. *PLoS One*. 2014;9(7):e102108. doi:10.1371/journal.pone.0102108
 109. Teodoro JS, Simões AM, Duarte F V., et al. Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective. *Toxicol Vitro*. 2011;25(3):664-670. doi:10.1016/j.tiv.2011.01.004

110. AshaRani P V., Hande MP, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* 2009;10:65. doi:10.1186/1471-2121-10-65
111. Sun X, Shi J, Zou X, Wang C, Yang Y, Zhang H. Silver nanoparticles interact with the cell membrane and increase endothelial permeability by promoting VE-cadherin internalization. *J Hazard Mater.* 2016;317:570-578. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.06.023
112. Walkey CD, Olsen JB, Song F, et al. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano.* 2014;8(3):2439-2455. doi:10.1021/nn406018q
113. Juling S, Niedzwiecka A, Böhmert L, et al. Protein Corona Analysis of Silver Nanoparticles Links to Their Cellular Effects. *J Proteome Res.* 2017;16(11):4020-4034. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00412
114. Slawson RM, Lohmeier-Vogel EM, Lee H, Trevors JT. Silver resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *Biometals.* 1994;7:30-40. doi:10.1007/BF00205191
115. Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat Nanotechnol.* 2018;13:65-71. doi:10.1038/s41565-017-0013-y
116. Pomastowski P, Sprynskyy M, Žuvela P, et al. Silver-Lactoferrin Nanocomplexes as a Potent Antimicrobial Agent. *J Am Chem Soc.* 2016;138(25):7899-7909. doi:10.1021/jacs.6b02699
117. López-Carballo G, Higuera L, Gavara R, Hernández-Muñoz P. Silver ions release from antibacterial chitosan films containing in situ generated silver nanoparticles. *J Agric Food Chem.* 2013;61(1):260-267. doi:10.1021/jf304006y
118. Yang CH, Wang LS, Chen SY, et al. Microfluidic assisted synthesis of silver nanoparticle–chitosan composite microparticles for antibacterial applications. *Int J Pharm.* 2016;510(2):493-500. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.01.010
119. Gurunathan S, Lee KJ, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials.* 2009;30(31):6341-6350. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.008
120. Jadhav K, Deore S, Dhamecha D, et al. Phytosynthesis of Silver Nanoparticles: Characterization, Biocompatibility Studies, and Anticancer Activity. *ACS Biomater Sci Eng.* 2018;4(3):892-899. doi:10.1021/acsbiomaterials.7b00707
121. Manivannan K, Cheng CC, Anbazhagan R, Tsai HC, Chen JK. Fabrication of silver seeds and nanoparticle on core-shell Ag@SiO₂ nanohybrids for combined photothermal therapy and bioimaging. *J Colloid Interface Sci.* 2019;537:604-614. doi:10.1016/j.jcis.2018.11.051
122. Hsu JC, Cruz ED, Lau KC, et al. Renally Excretable and Size-Tunable Silver Sulfide Nanoparticles for Dual-Energy Mammography or Computed Tomography. *Chem Mater.* 2019;31(19):7845-7854. doi:10.1021/acs.chemmater.9b01750
123. Li C, Yang W, Yuan R, Xu W. Antibody-responsive signal-off fluorescence of DNA-harbored silver nanoclusters for direct, rapid and sensitive immunoassay. *Sensors Actuators, B Chem.* 2019;301:127148. doi:10.1016/j.snb.2019.127148

124. Kibis LS, Stadnichenko AI, Pajetnov EM, Koscheev S V., Zaykovskii VI, Boronin AI. The investigation of oxidized silver nanoparticles prepared by thermal evaporation and radio-frequency sputtering of metallic silver under oxygen. *Appl Surf Sci.* 2010;257(2):404-413. doi:10.1016/j.apsusc.2010.07.002
125. Miranzadeh M, Kassae MZ. Solvent effects on arc discharge fabrication of durable silver nanopowder and its application as a recyclable catalyst for elimination of toxic p-nitrophenol. *Chem Eng J.* 2014;257:105-111. doi:10.1016/j.cej.2014.06.088
126. Kylián O, Kuzminova A, Štefaníková R, et al. Silver/plasma polymer strawberry-like nanoparticles produced by gas-phase synthesis. *Mater Lett.* 2019;253:238-241. doi:10.1016/j.matlet.2019.06.069
127. Biswas A, Bayer IS, Biris AS, Wang T, Dervishi E, Faupel F. Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. *Adv Colloid Interface Sci.* 2012;170(1-2):2-27. doi:10.1016/j.cis.2011.11.001
128. Eisa WH, Zayed MF, Anis B, Abbas LM, Ali SSM, Mostafa AM. Clean production of powdery silver nanoparticles using Zingiber officinale: The structural and catalytic properties. *J Clean Prod.* 2019;241:118398. doi:10.1016/j.jclepro.2019.118398
129. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9):1534. doi:10.3390/ijms17091534
130. Thanh NTK, Maclean N, Mahiddine S. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chem Rev.* 2014;114(15):7610-7630. doi:10.1021/cr400544s
131. Sangar S, Sharma S, Vats VK, Mehta SK, Singh K. Biosynthesis of silver nanocrystals, their kinetic profile from nucleation to growth and optical sensing of mercuric ions. *J Clean Prod.* 2019;228:294-302. doi:10.1016/j.jclepro.2019.04.238
132. Henglein A, Giersig M. Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate. *J Phys Chem B.* 1999;103(44):9533-9539. doi:10.1021/jp9925334
133. Blommaerts N, Vanrompay H, Nuti S, Lenaerts S, Bals S, Verbruggen SW. Unraveling Structural Information of Turkevich Synthesized Plasmonic Gold–Silver Bimetallic Nanoparticles. *Small.* 2019;15(42):1902791. doi:10.1002/sml.201902791
134. Desai R, Mankad V, Gupta SK, Jha PK. Size distribution of silver nanoparticles: UV-visible spectroscopic assessment. *Nanosci Nanotechnol Lett.* 2012;4(1):30-34. doi:10.1166/nnl.2012.1278
135. Polte J, Tuae X, Wuithschick M, et al. Formation mechanism of colloidal silver nanoparticles: Analogies and differences to the growth of gold nanoparticles. *ACS Nano.* 2012;6(7):5791-5802. doi:10.1021/nn301724z
136. Hegde H, Santhosh C, Sinha RK. Seed mediated synthesis of highly stable CTAB capped triangular silver nanoplates for LSPR sensing. *Mater Res Express.* 2019;6(10):105075. doi:10.1088/2053-1591/ab3d8c
137. Liu T, Yin B, He T, Guo N, Dong L, Yin Y. Complementary effects of nanosilver and

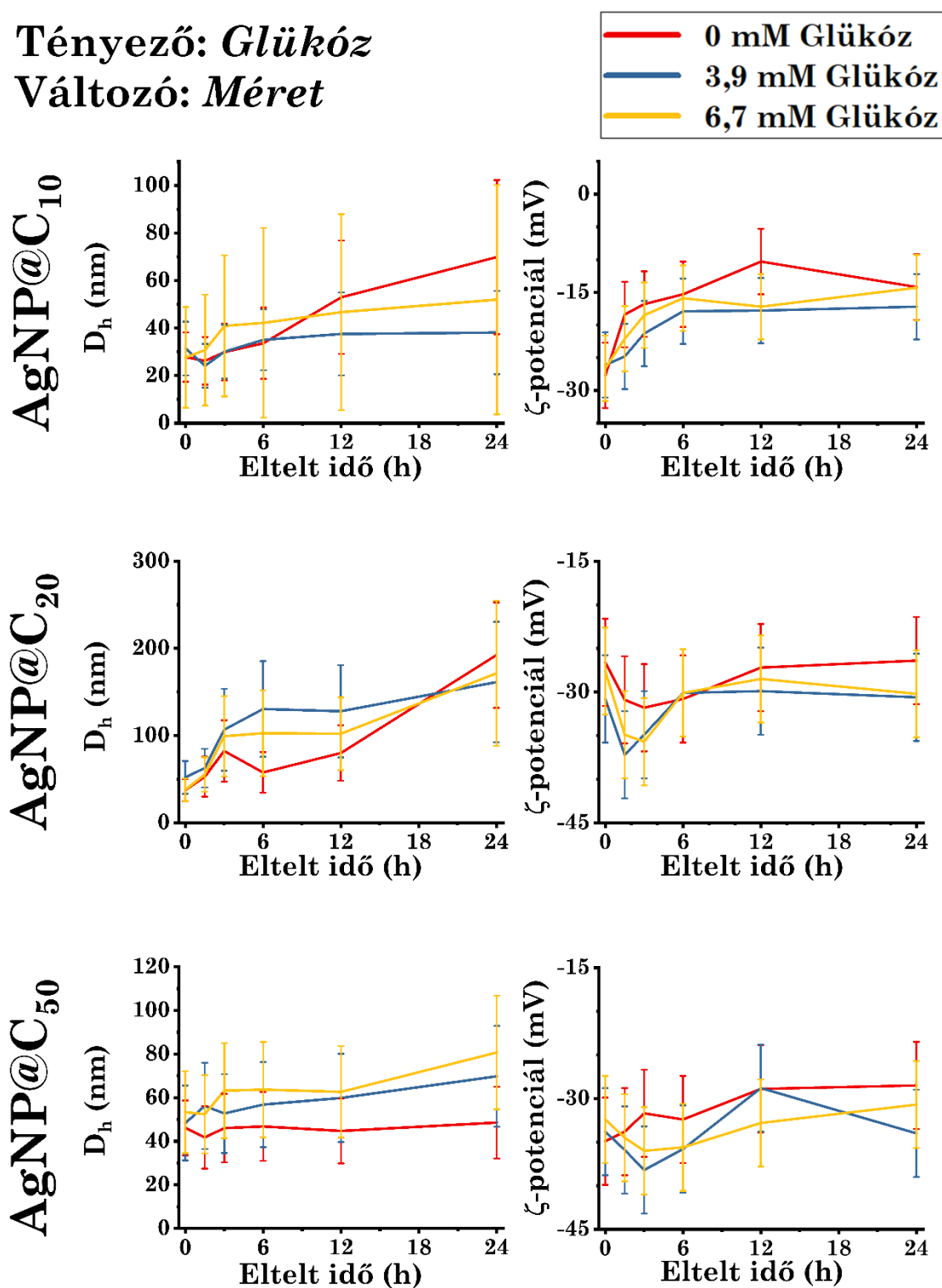
- superhydrophobic coatings on the prevention of marine bacterial adhesion. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2012;4(9):4683-4690. doi:10.1021/am301049v
138. Chen Z, Balankura T, Fichthorn KA, Rioux RM. Revisiting the Polyol Synthesis of Silver Nanostructures: Role of Chloride in Nanocube Formation. *ACS Nano*. 2019;13(2):1849-1860. doi:10.1021/acsnano.8b08019
 139. Da Silva RR, Yang M, Choi S Il, et al. Facile Synthesis of Sub-20 nm Silver Nanowires through a Bromide-Mediated Polyol Method. *ACS Nano*. 2016;10(8):7892-7900. doi:10.1021/acsnano.6b03806
 140. Shankar S, Rhim JW. Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite films. *Carbohydr Polym*. 2015;130:353-363. doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.018
 141. Hernández-Morales L, Espinoza-Gómez H, Flores-López LZ, et al. Study of the green synthesis of silver nanoparticles using a natural extract of dark or white *Salvia hispanica* L. seeds and their antibacterial application. *Appl Surf Sci*. 2019;489:952-961. doi:10.1016/j.apsusc.2019.06.031
 142. Thomas RK, Sukumaran S, Sudarsanakumar C. An insight into the comparative binding affinities of chlorogenic acid functionalized gold and silver nanoparticles with ctDNA along with its cytotoxicity analysis. *J Mol Liq*. 2019;287:110911. doi:10.1016/j.molliq.2019.110911
 143. Kosa SA, Zaheer Z. Betanin assisted synthesis of betanin@silver nanoparticles and their enhanced adsorption and biological activities. *Food Chem*. 2019;298:125014. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125014
 144. Song Z, Wu Y, Wang H, Han H. Synergistic antibacterial effects of curcumin modified silver nanoparticles through ROS-mediated pathways. *Mater Sci Eng C*. 2019;99:255-263. doi:10.1016/j.msec.2018.12.053
 145. Rónavári A, Kovács D, Igaz N, et al. Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study. *Int J Nanomedicine*. 2017;Volume 12:871-883. doi:10.2147/IJN.S122842
 146. Rónavári A, Igaz N, Gopisetty MK, et al. Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:695-703. doi:10.2147/IJN.S152010
 147. Pennycook SJ, Nellist PD. *Scanning Transmission Electron Microscopy*. (Pennycook SJ, Nellist PD, eds.). New York, NY: Springer New York; 2011. doi:10.1007/978-1-4419-7200-2
 148. Bokhonov BB, Sharafutdinov MR, Whitcomb DR, Burleva LP. In situ self-assembly of silver nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2014;118(22):11980-11989. doi:10.1021/jp501508a
 149. Graf C, Nordmeyer D, Sengstock C, et al. Shape-Dependent Dissolution and Cellular Uptake of Silver Nanoparticles. *Langmuir*. 2018;34(4):1506-1519. doi:10.1021/acs.langmuir.7b03126

150. Reymond-Laruinaz S, Saviot L, Potin V, Marco de Lucas M del C. Protein–nanoparticle interaction in bioconjugated silver nanoparticles: A transmission electron microscopy and surface enhanced Raman spectroscopy study. *Appl Surf Sci.* 2016;389:17-24. doi:10.1016/j.apsusc.2016.07.082
151. Qin D, Yang G, Wang Y, Zhou Y, Zhang L. Green synthesis of biocompatible trypsin-conjugated Ag nanocomposite with antibacterial activity. *Appl Surf Sci.* 2019;469:528-536. doi:10.1016/j.apsusc.2018.11.057
152. Danciu C, Falamas A, Dehelean C, et al. A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. *Cancer Cell Int.* 2013;13:75. doi:10.1186/1475-2867-13-75
153. Gross H, Singer W, Totzeck M. *Handbook of Optical Systems*. Vol 2. (Gross H, Singer W, Totzeck M, eds.). Wiley; 2005. doi:10.1002/3527606688
154. Pereyra P. *Fundamentals of Quantum Physics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. doi:10.1007/978-3-642-29378-8
155. Rycenga M, Cobley CM, Zeng J, et al. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chem Rev.* 2011;111(6):3669-3712. doi:10.1021/cr100275d
156. García MA. Surface Plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications. *J Phys D Appl Phys.* 2012;44(28). doi:10.1088/0022-3727/45/38/38950
157. Huang T, Xu XN. Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. *J Mater Chem.* 2010;20(44):9867-9876. doi:10.1039/c0jm01990a
158. Railean-Plugaru V, Pomastowski P, Wypij M, et al. Study of silver nanoparticles synthesized by acidophilic strain of *Actinobacteria* isolated from the of *Picea sitchensis* forest soil. *J Appl Microbiol.* 2016;120(5):1250-1263. doi:10.1111/jam.13093
159. Wijaya YN, Kim J, Choi WM, Park SH, Kim MH. A systematic study of triangular silver nanoplates: One-pot green synthesis, chemical stability, and sensing application. *Nanoscale.* 2017;9(32):11705-11712. doi:10.1039/c7nr03077k
160. Luo M, Huang H, Choi S Il, et al. Facile Synthesis of Ag Nanorods with No Plasmon Resonance Peak in the Visible Region by Using Pd Decahedra of 16 nm in Size as Seeds. *ACS Nano.* 2015;9(10):10523-10532. doi:10.1021/acsnano.5b05053
161. Chaudhari K, Ahuja T, Murugesan V, et al. Appearance of SERS activity in single silver nanoparticles by laser-induced reshaping. *Nanoscale.* 2019;11(1):321-330. doi:10.1039/c8nr06497k
162. Hartland G V., Besteiro L V., Johns P, Govorov AO. What's so Hot about Electrons in Metal Nanoparticles? *ACS Energy Lett.* 2017;2(7):1641-1653. doi:10.1021/acsenerylett.7b00333
163. Jiang P, Dong Y, Yang L, Zhao Y, Xie W. Hot Electron-Induced Carbon-Halogen Bond Cleavage Monitored by in Situ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J Phys Chem C.*

- 2019;123(27):16741-16746. doi:10.1021/acs.jpcc.9b03238
164. Kararli TT. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos.* 1995;16(5):351-380. doi:10.1002/bdd.2510160502
 165. Strazzullo P, Leclercq C. Sodium. *Adv Nutr.* 2014;5(2):188-190. doi:10.3945/an.113.005215
 166. Eichelberger L, Richter RB. Water, Nitrogen and Electrolyte Concentration in the Brain. *J Biol Chem.* 1944;154:21-29.
 167. Freckmann G, Hagenlocher S, Baumstark A, et al. Continuous glucose profiles in healthy subjects under everyday life conditions and after different meals. *J Diabetes Sci Technol.* 2007;1(5):695-703. doi:10.1177/193229680700100513
 168. Cory JG, Cory AH. Critical Roles of Glutamine as Nitrogen Donors in Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis: Asparaginase Treatment in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *In Vivo (Brooklyn).* 2006;20(5).
 169. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol.* 2017;16(2):99-117. doi:10.1002/rmb2.12024
 170. Bélteky P, Rónavári A, Igaz N, et al. Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity. *Int J Nanomedicine.* 2019;Volume 14:667-687. doi:10.2147/IJN.S185965
 171. Wan Y, Guo Z, Jiang X, et al. Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee–Meisel method. *J Colloid Interface Sci.* 2013;394:263-268. doi:10.1016/j.jcis.2012.12.037
 172. Ravindran A, Singh A, Raichur AM, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2010;76(1):32-37. doi:10.1016/J.COLSURFB.2009.10.005
 173. Levak M, Burić P, Dutour Sikirić M, et al. Effect of Protein Corona on Silver Nanoparticle Stabilization and Ion Release Kinetics in Artificial Seawater. *Environ Sci Technol.* 2017;51(3):1259-1266. doi:10.1021/acs.est.6b03161
 174. Bhattacharjee S, Elimelech M, Borkovec M. DLVO Interaction between Colloidal Particles: Beyond Derjaguin's Approximation. *Croat Chem Acta.* 1998;71(4):883-903.
 175. Wiese GR, Healy TW. Effect of particle size on colloid stability. *Trans Faraday Soc.* 1970;66(0):490-499. doi:10.1039/TF9706600490
 176. Bélteky P, Rónavári A, Zakupszky D, et al. Are Smaller Nanoparticles Always Better? Understanding the Biological Effect of Size-Dependent Silver Nanoparticle Aggregation Under Biorelevant Conditions. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:3021-3040. doi:10.2147/IJN.S304138
 177. Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol Adv.* 2007;25(3):244-263. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.01.002

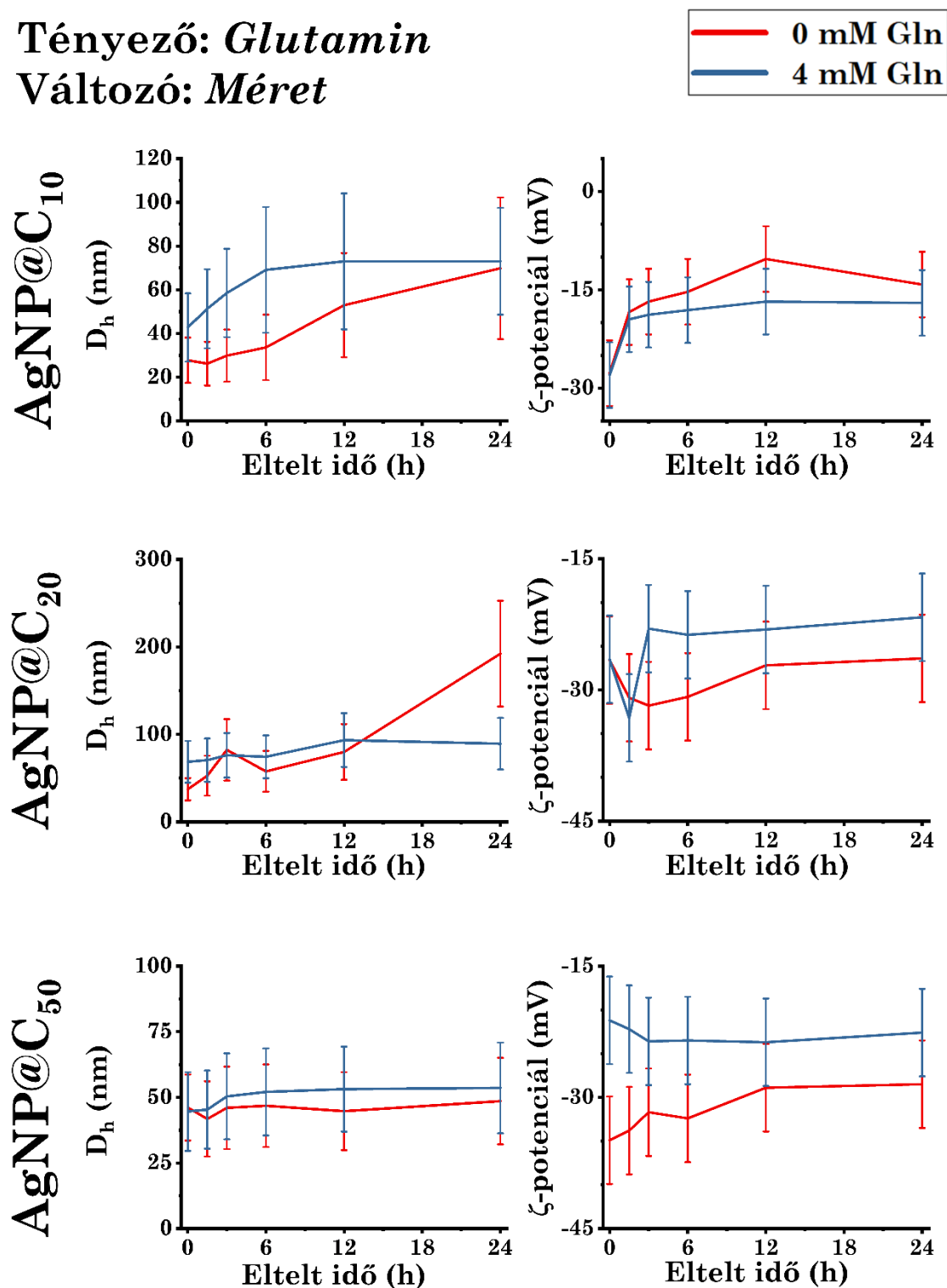
178. Li X, Lenhart JJ, Walker HW. Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Langmuir*. 2010;26(22):16690-16698. doi:10.1021/la101768n
179. Franco P, De Marco I. The use of poly(N-vinyl pyrrolidone) in the delivery of drugs: A review. *Polymers (Basel)*. 2020;12(5):1114. doi:10.3390/POLYM12051114
180. Nair B. Final Report On the Safety Assessment of Polyvinylpyrrolidone (PVP). *Int J Toxicol*. 1998;17(Suppl. 4):95-130. doi:10.1177/109158189801700408
181. Huynh KA, Chen KL. Aggregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *Environ Sci Technol*. 2011;45(13):5564-5571. doi:10.1021/es200157h
182. He D, Bligh MW, Waite TD. Effects of aggregate structure on the dissolution kinetics of citrate-stabilized silver nanoparticles. *Environ Sci Technol*. 2013;47(16):9148-9156. doi:10.1021/es400391a
183. Brahma S, Rao KJ, Shivashankar S. Rapid growth of nanotubes and nanorods of würtzite ZnO through microwave-irradiation of a metalorganic complex of zinc and a surfactant in solution. *Bull Mater Sci*. 2010;33(2):89-95. doi:10.1007/s12034-010-0027-7
184. Corp S-A. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME) - Formulation*. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/154/333/d5030for.pdf>. Accessed June 12, 2021.
185. Thompson GL, Reukov V V., Nikiforov MP, Jesse S, Kalinin S V., Vertegel AA. Electromechanical and elastic probing of bacteria in a cell culture medium. *Nanotechnology*. 2012;23(24):245705-245715. doi:10.1088/0957-4484/23/24/245705
186. Alarcon EI, Bueno-Alejo CJ, Noel CW, et al. Human serum albumin as protecting agent of silver nanoparticles: role of the protein conformation and amine groups in the nanoparticle stabilization. *J Nanoparticle Res*. 2013;15(1):1374. doi:10.1007/s11051-012-1374-7
187. Pal NK, Kryschi C. A facile synthesis of highly stable and luminescent Ag clusters: A steady-state and time-resolved spectroscopy study. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17(3):1957-1965. doi:10.1039/c4cp03683b
188. Trinh ND, Nguyen TTB, Nguyen TH. Preparation and characterization of silver chloride nanoparticles as an antibacterial agent. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2015;6(4):045011. doi:10.1088/2043-6262/6/4/045011
189. Szerencsés B, Igaz N, Tóbiás Á, et al. Size-dependent activity of silver nanoparticles on the morphological switch and biofilm formation of opportunistic pathogenic yeasts. *BMC Microbiol*. 2020;20(176):13. doi:10.1186/s12866-020-01858-9

Tényező: *Glükóz*
Változó: *Méret*



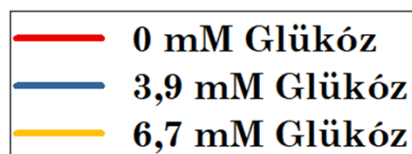
1. melléklet ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérőinek és zéta-potenciáljainak változása különböző glükóz koncentrációk mellett, 7,2-es pH értéken

Tényező: *Glutamin*
Változó: *Méret*

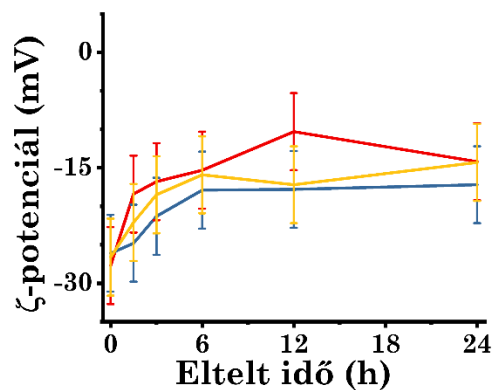
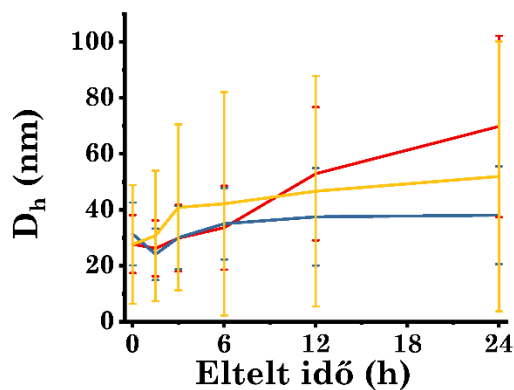


2. melléklet ábra 10, 20 és 50 nm-es, citrát csoportokkal stabilizált ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérőinek és zéta-potenciáljainak változása glutamin jelenlétében vagy hiányában, 7,2-es pH értéken

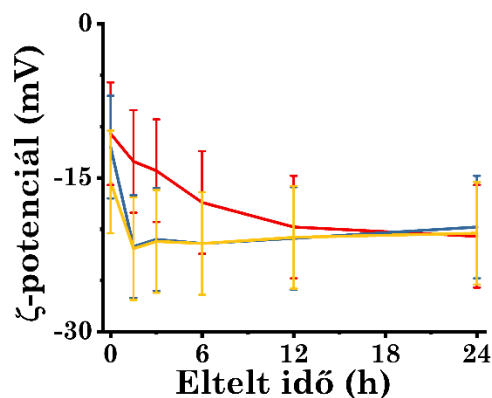
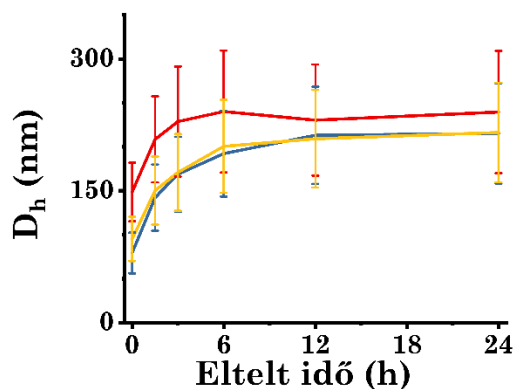
Tényező: *Glükóz*
Változó: *Stabilizálószer*



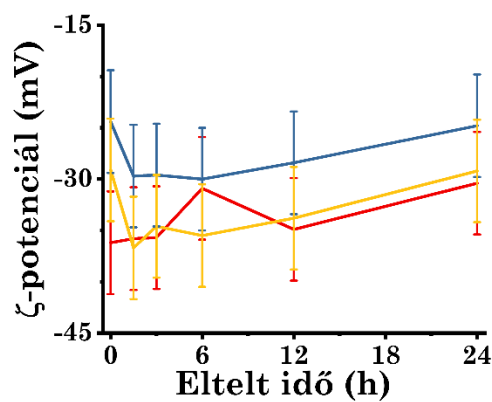
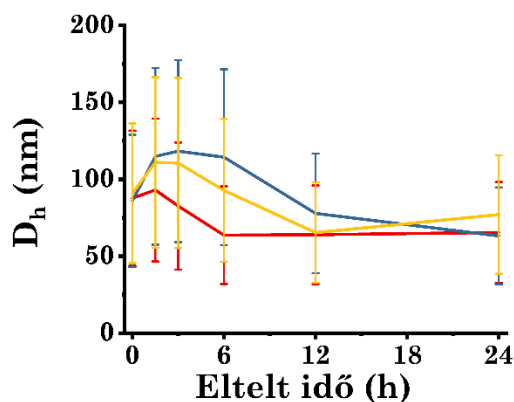
AgNP@C₁₀



AgNP@PVP₁₀

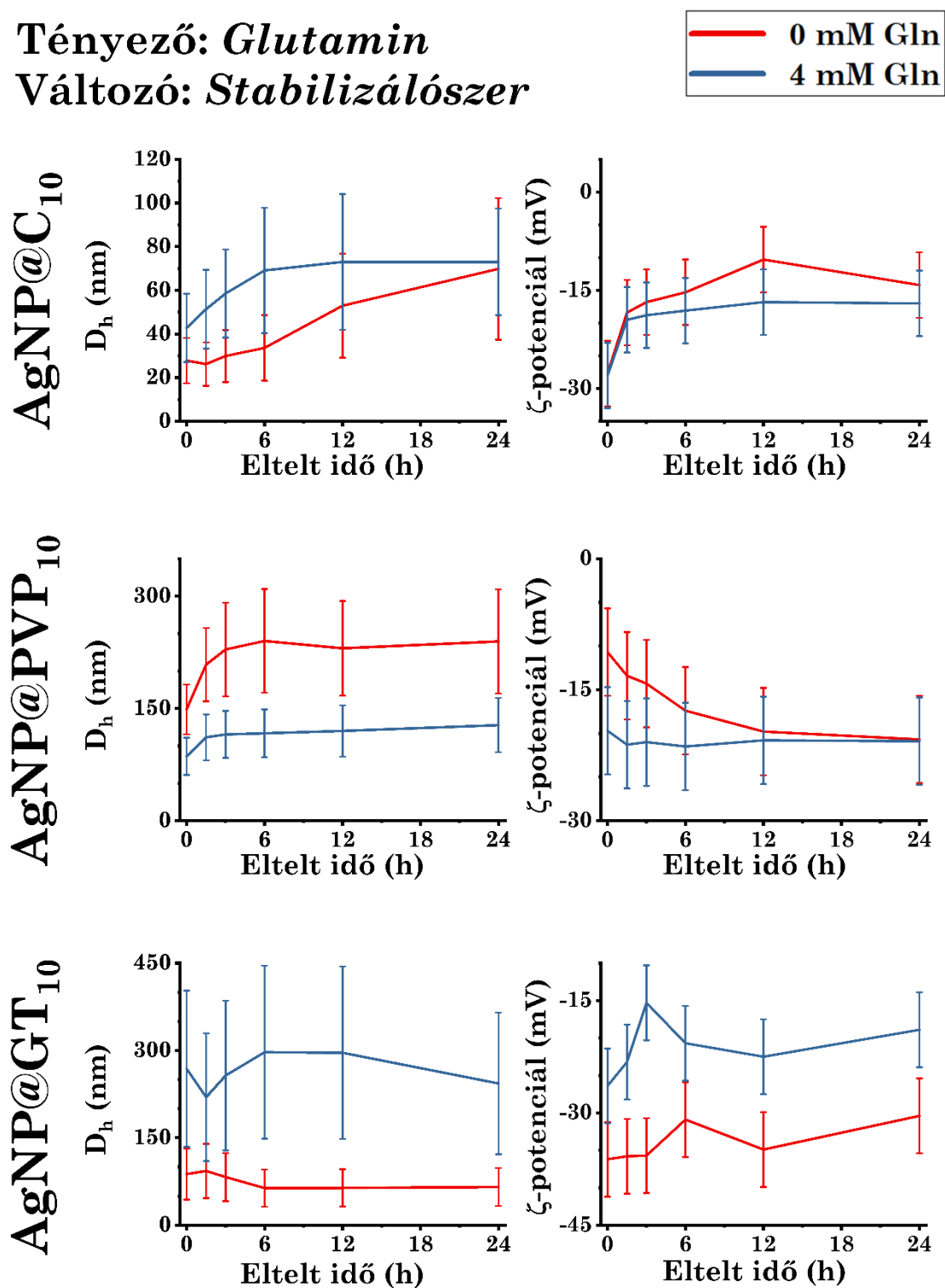


AgNP@GT₁₀



3. melléklet ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérőinek és zéta-potenciáljainak változása különböző glükóz koncentrációk mellett, 7,2-es pH értéken

Tényező: *Glutamin*
Változó: *Stabilizálószer*



4. melléklet ábra Citrát csoportokkal, polivinil-pirrolidonnal, illetve zöld tea extraktummal stabilizált, 10 nm-es ezüst nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérőinek és zéta-potenciáljainak változása különböző glutamin jelenlétében és hiányában, 7,2-es pH értéken

<i>PdI</i>						
<i>Körülmény</i>	<i>Idő (h)</i>	<i>AgNP@GT₁₀</i>	<i>AgNP@PVP₁₀</i>	<i>AgNP@C₁₀</i>	<i>AgNP@C₂₀</i>	<i>AgNP@C₅₀</i>
<i>Referencia</i>	0	0,655	0,201	0,275	0,387	0,483
	1,5	0,524	0,221	0,231	0,564	0,472
	3	0,507	0,299	0,259	0,461	0,467
	6	0,516	0,333	0,335	0,413	0,452
	12	0,492	0,300	0,571	0,626	0,440
	24	0,460	0,337	0,712	0,491	0,461
<i>pH 3</i>	0	0,137	0,231	0,557	0,395	0,482
	1,5	0,193	0,292	0,582	0,464	0,373
	3	0,197	0,356	0,637	0,751	0,462
	6	0,224	0,353	0,796	0,634	0,643
	12	0,227	0,376	0,811	0,73	0,635
	24	0,245	0,418	0,863	0,652	0,566
<i>150 mM NaCl</i>	0	0,539	0,397	0,243	0,257	0,347
	1,5	0,489	0,216	0,345	0,341	0,366
	3	0,583	0,231	0,364	0,332	0,410
	6	0,512	0,212	0,425	0,421	0,615
	12	0,688	0,226	0,515	0,386	0,782
	24	0,515	0,221	0,746	0,539	0,709

1. melléklet táblázat Az ezüst nanorészecskék polidiszperzitási indexeinek (PdI) változása a referencia (pH 7,2, 10 mM NaCl), pH 3-as, illetve 150 mM nátrium-kloridos mérések során

<i>Ezüst nanorészecske minta</i>	<i>Sejtvonal</i>	<i>IC₅₀ (ppm)</i>
<i>AgNP@C₁₀</i>	HaCaT	1,96
	DU145	8,28
	MRC-5	17,6
	A549	72,2
<i>AgNP@C₂₀</i>	HaCaT	3,08
	DU145	10,41
<i>AgNP@C₅₀</i>	HaCaT	11,67
	DU145	12,53
<i>AgNP@PVP₁₀</i>	HaCaT	2,74
	HeLa	15,22
<i>AgNP@GT₁₀</i>	MRC-5	1,3
	A549	63,1

2. melléklet táblázat A szintetizált AgNP minták IC₅₀ értékei

Ezüst nanorészecske minta	Törzs	MIC (ppm)
AgNP@C ₁₀	<i>C. neoformans</i>	18,75
	<i>B. megaterium</i>	18,75
	<i>E. coli</i>	37,50
AgNP@C ₂₀	<i>C. neoformans</i>	15,63
	<i>B. megaterium</i>	7,81
	<i>E. coli</i>	62,50
AgNP@C ₅₀	<i>C. neoformans</i>	15,63
	<i>B. megaterium</i>	7,81
	<i>E. coli</i>	62,50
AgNP@PVP ₁₀	<i>C. neoformans</i>	1,95
	<i>B. megaterium</i>	3,90
	<i>E. coli</i>	3,90
AgNP@GT ₁₀	<i>C. neoformans</i>	0,59
	<i>B. megaterium</i>	0,59
	<i>E. coli</i>	0,59

3. melléklet táblázat A szintetizált AgNP minták MIC értékei